

**Die Spaltung cyanogener Diglucoside:
Reinigung und Charakterisierung von Diglucosidasen
aus *Hevea brasiliensis* und *Davallia bullata***

Der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von
Susanne Hillmar
aus Braunschweig

1. Referent: Prof. Dr. D. Selmar
2. Referent: Prof. Dr. B. Biehl
Eingereicht am: 11. Februar 1999
Mündliche Prüfung am: 09. Juni 1999
(1999)

Für meine Eltern

Die Experimente zu der vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von Juli 1993 bis November 1997 am Botanischen Institut der Technischen Universität Braunschweig durchgeführt. Teile dieser Arbeit sind von der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen eines Forschungsprogramms von Herrn Prof. Dr. D. Selmar finanziell unterstützt worden.

Herrn Prof. Dr. D. Selmar danke ich ganz besonders für die vielen Anregungen, hilfreichen Diskussionen und kritischen Hinweise, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Darüber hinaus möchte ich Ihm für die Bereitstellung der Laborausrüstung Dank sagen.

Herrn Prof. Dr. B. Biehl möchte ich für die Übernahme des Korreferates und die stets gewährte Unterstützung danken.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Diplomarbeiten durchgeführt. Allen Beteiligten möchte ich für die gute Zusammenarbeit danken.

Herrn Dr. M. Müller (CEPLAC-Institut, Brasilien) danke ich für die stets zügige Versorgung mit Samen von *Hevea brasiliensis*.

Den Gärtnern des Botanischen Gartens der TU Braunschweig danke ich für die Pflege der *Hevea*-Pflanzen.

Herrn Christian Buschbaum möchte ich ganz herzlich für die sehr gute Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Reinigung der simultane Diglucosidase aus *Davallia bullata* danken.

Allen Mitarbeitern des Botanischen Institutes möchte ich für das angenehme und kollegiale Arbeitsklima danken, das mir über manche Rückschläge in der Arbeit hinweg geholfen hat. Des weiteren möchte ich mich bei Sabine Selmar und Dagmar Wrann für die stets hervorragende technische Assistenz bedanken.

Bei allen, die bei der endgültigen Fertigstellung dieser Arbeit geholfen haben, bedanke ich mich an dieser Stelle recht herzlich.

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge:

HILLMAR, S., SELMAR, D.: Eine sequentielle Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* katalysiert die Umwandlung des cyanogenen Diglucosids Linustatin zum Monoglucosid Linamarin. (Poster) Tagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Bayreuth (1994).

HILLMAR, S., SELMAR, D.: Characterization of a sequential diglucosidase involved in translocation of cyanogenic glucosides. (Poster) 43. Annual Congress on Medical Plant Research, Halle (1995).

BUSCHBAUM, C., HILLMAR, S., SELMAR, D.: Purification of a simultaneous diglucosidase from *Davallia bullata*. (Poster) Tagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Bremen (1998).

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
2	MATERIAL UND METHODEN.....	11
2.1	Pflanzenmaterial	11
2.1.1	<i>Hevea brasiliensis</i>	11
2.1.1.1	Definition der Blattstadien von <i>Hevea brasiliensis</i>	11
2.1.1.2	Blattmaterial.....	12
2.1.1.3	Samen.....	12
2.1.1.4	Sämlingsanzucht.....	13
2.1.2	<i>Davallia bullata</i>	13
2.2	Enzympräparationen.....	13
2.2.1	Herstellung eines Enzymrohextraktes aus <i>Hevea</i> -Blättern.....	13
2.2.1.1	Niedersalzproteinextrakt.....	14
2.2.1.2	Hochsalzproteinextrakt	14
2.2.2	Herstellung eines Enzymrohextraktes aus Samen und Sämlingen von <i>Hevea brasiliensis</i>	14
2.2.3	Herstellung eines Enzymrohextraktes aus Wedeln des Farnes <i>Davallia bullata</i>	15
2.3	Reinigung der sequentiellen Diglucosidase aus <i>Hevea brasiliensis</i>	16
2.3.1	80 %ige Ammoniumsulfatfällung	16
2.3.2	Gelfiltration mit Superdex 200®	17
2.3.3	Kationenaustauscherchromatographie mit CM Bio-Gel A®	17
2.3.4	Präparative native kationische Polyacrylamid-Gelelektrophorese ...	18
2.4	Reinigung der simultanen Diglucosidase aus <i>Davallia bullata</i>	20
2.4.1	Immobilisierte Metall-Ionen Affinitätschromatographie	20
2.4.2	DEAE-Sephacel®-Anionenaustauscherchromatographie.....	21
2.4.3	Chromatographie mit Hydroxyapatit.....	22
2.4.4	Präparative native anionische Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	23
2.4.5	Gelfiltration mit Superdex 200®	24
2.5	Weitere verwendete Gelelektrophorese-Systeme.....	25
2.5.1	Präparative native anionische Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	25
2.5.2	Analytische native kationische Polyacrylamid-Gelelektrophorese....	26

2.5.3	Extraktion der sequentiellen Diglucosidase aus einem nativen Gel .	27
2.5.4	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	28
2.5.5	Silberfärbung der Polyacrylamidgele.....	29
2.5.6	Färbung der Polyacrylamidgele mit Periodsäure-Silberfärbung.....	29
2.5.7	Färbung der Polyacrylamidgele mit Coomassie Brilliant Blue	30
2.5.8	Aktivitätsanfärbung der nativen Gele mit 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucosid.....	30
2.6	Verwendung weiterer chromatographischer Trennmedien für die Reinigung der sequentiellen Diglucosidase aus <i>Hevea brasiliensis</i>	31
2.6.1	Gelfiltration mit Sephacryl S-300®.....	31
2.6.2	Hydrophobe Interaktionschromatographie mit Phenylsepharose 6 Fast Flow®	32
2.6.3	Hydroxyapatit.....	32
2.6.4	Affinitätschromatographie mit Con A-Sepharose 4B®	33
2.6.5	Anionenaustauscherchromatographie mit Q Sepharose High Performance®	34
2.6.6	Anionenaustauscherchromatographie mit DEAE-Sepharcel®.....	34
2.7	Bestimmung der Enzymaktivitäten	35
2.7.1	Simultane Diglucosidase.....	35
2.7.2	Sequentielle Diglucosidase	36
2.7.2.1	Bestimmung der Enzymaktivität der sequentiellen Digluco- sidase mit Amygdalin als Substrat	38
2.7.2.2	Glucosebestimmung.....	38
2.7.2.3	Cyanidbestimmung.....	39
2.7.2.4	Bestimmung der Enzymaktivität der sequentiellen Digluco- sidase mit p-Nitrophenyl- β -D-glucosid als Substrat	40
2.7.2.5	Bestimmung der Linamarase-Aktivität.....	40
2.7.3	Kinetische Daten der sequentiellen Diglucosidase aus <i>Hevea</i> <i>brasiliensis</i>	41
2.7.3.1	Aktivitätsbestimmung bei unterschiedlichen pH-Werten	41
2.7.3.2	Aktivitätsbestimmung bei unterschiedlichen Inkubationszeiten..	41
2.7.3.3	Aktivitätsbestimmung bei unterschiedlichen Inkubations- temperaturen.....	41

2.8	Analyse der Spaltprodukte des Linustatinabbaus mit der HPLC	42
2.8.1	Derivatisierung der Produkte des enzymatischen Linustatinabbaus mit Pyridin/Benzoylchlorid.....	42
2.9	Proteinbestimmung	43
2.9.1	Methode nach Bradford	43
2.9.2	Methode mit dem Fluoreszenzfarbstoff NanoOrange®	44
2.10	Aktivatoren und Hemmstoffe der sequentiellen und der simultanen Diglucosidase	44
2.10.1	Einfluß von Metallionen auf die Aktivitäten der sequentiellen und der simultanen Diglucosidase	44
2.10.2	Einfluß von β -Glucosidase-Hemmstoffen auf die Aktivitäten der sequentiellen und der simultanen Diglucosidase	45
2.10.3	Beeinflussung der Aktivitäten der sequentiellen und der simultanen Diglucosidase durch andere Effektoren.....	46
2.11	Präzipitationsversuche mit einem β -Glucosidase-Antiserum	46
2.12	Adsorptionsverhalten der sequentiellen Diglucosidase aus <i>Hevea</i> <i>brasiliensis</i>	47
2.12.1	Adsorption der sequentiellen Diglucosidase an Membran- materialien	47
2.12.2	Adsorption der sequentiellen Diglucosidase an Zellwandtrümmer...	48
3	ERGEBNISSE	49
3.1	Sequentielle und simultane Diglucosidasen in <i>Hevea brasiliensis</i>	50
3.1.1	Pflanzenmaterial.....	50
3.1.2	Nachweis einer sequentiellen Diglucosidase in Blättern von <i>Hevea</i> <i>brasiliensis</i>	51
3.1.3	Nachweis einer simultanen Diglucosidase in Blättern von <i>Hevea</i> <i>brasiliensis</i>	51
3.1.4	Änderung der Aktivität der sequentiellen und der simultanen Diglucosidase während der Blattentwicklung.....	52
3.1.5	Verteilung der Aktivität der sequentiellen und der simultanen Diglucosidase in Homogenisationsextrakten.....	55
3.1.6	Besonderheiten bei der Bestimmung der Aktivität der sequentiellen Diglucosidase aus <i>Hevea brasiliensis</i>	56

3.1.7	Analyse der Spaltprodukte des cyanogenen Diglucosids Linustatin mit Hilfe der HPLC und UV-Detektion.....	58
3.1.8	Präzipitationsversuche mit dem β -Glucosidase Antiserum aus Kaninchen.....	62
3.1.9	Adsorption der sequentiellen Diglucosidase an die Extraktionsrückstände einer Aufarbeitung aus <i>Hevea</i> -Blättern.....	64
3.1.10	Kinetische Daten der <i>in vitro</i> Aktivitätsbestimmung der sequentiellen Diglucosidase	64
3.1.11	Stabilitätsuntersuchungen der sequentiellen Diglucosidase aus <i>Hevea brasiliensis</i>	72
3.2	Reinigung der sequentiellen Diglucosidase aus <i>Hevea brasiliensis</i>	73
3.3	Bilanzierung der Reinigungsschritte der sequentiellen Diglucosidase aus <i>Hevea brasiliensis</i>	85
3.4	Charakterisierung der sequentiellen Diglucosidase aus <i>Hevea brasiliensis</i>	88
3.5	Kinetische Daten der sequentiellen Diglucosidase aus <i>Hevea brasiliensis</i>	92
3.5.1	Bestimmung der Michaelis-Konstanten (K_M) und der maximalen Umsatzgeschwindigkeiten (v_{max})	92
3.5.2	Einfluß von β -Glucosidase-Hemmstoffen.....	96
3.6	Verwendung weiterer chromatographischer Trennmedien für die Reinigung der sequentiellen Diglucosidase aus <i>Hevea brasiliensis</i>	97
3.7	Partielle Reinigung der simultanen Diglucosidase aus <i>Hevea brasiliensis</i>	102
3.8	Untersuchungen zur Aktivitätsverteilung der sequentiellen und der simultanen Diglucosidase in <i>Hevea</i> -Sämlingen während der Keimung.....	107
3.9	Simultane Diglucosidase aus <i>Davallia bullata</i>	118
3.9.1	Optimierung der <i>in vitro</i> Aktivitätsbestimmung der simultanen Diglucosidase.....	118
3.9.2	Stabilitätsuntersuchungen der simultanen Diglucosidase aus <i>Davallia bullata</i>	123
3.9.3	Reinigung der simultanen Diglucosidase aus <i>Davallia bullata</i>	123

3.10	Bilanzierung der Reinigungsschritte der simultanen Diglucosidase aus <i>Davallia bullata</i>	130
3.11	Charakterisierung der simultanen Diglucosidase aus <i>Davallia bullata</i>	131
4	DISKUSSION	132
4.1	Einleitung	132
4.2	Fungieren cyanogene Diglucoside als Transportmetabolite?	137
4.3	Der simultane Spaltungsweg.....	138
4.4	Der sequentielle Spaltungsweg.....	138
4.5	Das Modell <i>Hevea brasiliensis</i>	139
4.6	Die sequentielle Diglucosidase aus <i>Hevea brasiliensis</i>	140
4.6.1	Affinität zur pflanzlichen Zellwand	140
4.6.2	Charakterisierung der sequentiellen Diglucosidase.....	141
4.6.3	Molekulargewicht der nativen Form.....	143
4.6.4	Abhängigkeit der Aktivitäten der Diglucosidasen vom Entwicklungsstadium der Pflanze.....	144
4.6.5	Lokalisierung der sequentiellen Diglucosidase	146
4.7	Die simultane Diglucosidase aus <i>Davallia bullata</i>	148
4.8	Ausblick.....	149
5	ZUSAMMENFASSUNG	152
6	LITERATURVERZEICHNIS	156

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Reaktionsschema der pflanzlichen Cyanogenese	1
Abbildung 2: Fixierungsmechanismus für HCN über die β -Cyanoalanin-Synthase und die β -Cyanoalanin-Hydrolase.....	3
Abbildung 3: Cyanogene Mono- und Diglucoside in <i>Hevea brasiliensis</i>	5
Abbildung 4: Verlagerung und Metabolisierung des cyanogenen Diglucosids Linustatin in <i>Hevea</i>	7
Abbildung 5: Spaltung von Linustatin durch Diglucosidasen	8
Abbildung 6: Abhängigkeit der Aktivitäten der sequentiellen und der simultanen Diglucosidase vom Entwicklungsstadium der Blätter von <i>Hevea brasiliensis</i>	53
Abbildung 7: HPLC-Chromatogramme von Standardsubstanzen und der Reaktionsprodukte des enzymatischen Linustatin-Abbaus.....	60
Abbildung 8: Präzipitationskurve für die β -Glucosidase aus <i>Hevea brasiliensis</i> in Hochsalzextrakten	63
Abbildung 9: Abhängigkeit der Aktivität der sequentiellen Diglucosidase vom pH-Wert	65
Abbildung 10: Abhängigkeit der Aktivität der sequentiellen Diglucosidase von der Inkubationszeit	67
Abbildung 11: Abhängigkeit der Aktivität der sequentiellen Diglucosidase von der Temperatur	69
Abbildung 12: Reduktion der β -Glucosidase-Aktivität in den Waschlösungen der Homogenisationsrückstände	74
Abbildung 13: Gelfiltration einer Hochsalzrohprotein-Lösung aus Blättern von <i>Hevea brasiliensis</i>	76
Abbildung 14: Elutionsprofil der Kationenaustauscher-Chromatographie mit einer CM Bio-Gel A-Agarose®-Säule	80
Abbildung 15: Unterschiedliche Detektion der sequentiellen Diglucosidase nach einer analytischen nativen kationischen Gelelektrophorese mit anschließender SDS-PAGE der aktiven Fraktionen.	81
Abbildung 16: Elutionsprofil der präparativen nativen anionischen Gelelektrophorese und anschließender SDS-PAGE	83

Abbildung 17: Elutionsprofil der präparativen nativen kationischen Polyacrylamid-Gelelektrophorese	84
Abbildung 18: SDS-Elektrophorese der Fraktionen mit sequentieller Diglucosidase im Verlauf der Proteinreinigung	87
Abbildung 19: SDS-Elektrophorese der sequentiellen Diglucosidase.....	88
Abbildung 20: Graphische Darstellung der Substratkinetiken nach Lineweaver-Burk und Hanes	94
Abbildung 21: Elutionsprofil der Superdex 200 [®] -Säule	106
Abbildung 22: Sämlingsstadien von <i>Hevea brasiliensis</i>	109
Abbildung 23: Aktivität einer sequentiellen Diglucosidase in unterschiedlichen Entwicklungsphasen des Endosperms	111
Abbildung 24: Aktivität einer sequentiellen Diglucosidase in unterschiedlichen Entwicklungsphasen der Kotyledonen	112
Abbildung 25: Aktivität einer sequentiellen Diglucosidase in unterschiedlichen Entwicklungsphasen des Sprosses	113
Abbildung 26: Aktivität einer sequentiellen Diglucosidase in unterschiedlichen Entwicklungsphasen der Wurzeln.....	114
Abbildung 27: Aktivität einer sequentiellen Diglucosidase in unterschiedlichen Entwicklungsphasen der Blätter	115
Abbildung 28: Abhängigkeit der Aktivität der simultanen Diglucosidase vom pH-Wert	121
Abbildung 29: Elutionsprofil der Chelating Sepharose HP [®] -Säule mit Nickel als Metallion	124
Abbildung 30: Elutionsprofil der DEAE-Sephacel [®] -Anionenaustauscher- Chromatographie	125
Abbildung 31: Elutionsprofil der Hydroxyapatit-Säule.....	126
Abbildung 32: Elutionsprofil der präparativen nativen anionischen Polyacrylamid-Gelelektrophorese	128
Abbildung 33: SDS-Gel der unterschiedlichen Reinigungsschritte der simultanen Diglucosidase aus <i>Davallia bullata</i>	129

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Definition der Blattstadien von <i>Hevea brasiliensis</i> nach Lieberei (1984).....	12
Tabelle 2: Abhängigkeit der Aktivitäten der sequentiellen und der simultanen Diglucosidase vom Entwicklungsstadium der Blätter von <i>Hevea brasiliensis</i>	54
Tabelle 3: Verteilung der sequentiellen Diglucosidase, der simultanen Diglucosidase und der β -Glucosidase in Homogenisationsextrakten ..	56
Tabelle 4: Einfluß verschiedener Effektoren auf die Aktivität der sequentiellen Diglucosidase.....	70
Tabelle 5: Aktivität der sequentiellen Diglucosidase in Aufarbeitungen aus <i>Hevea</i> -Blättern des Blattstadiums D mit und ohne Zusatz von Proteaseinhibitoren.....	72
Tabelle 6: Adsorption der sequentiellen Diglucosidase an Membranmaterialien	78
Tabelle 7: Reinigung der sequentiellen Diglucosidase aus <i>Hevea brasiliensis</i>	86
Tabelle 8: Substratspektrum der sequentiellen Diglucosidase aus <i>Hevea brasiliensis</i>	90
Tabelle 9: K_M - und v_{max} -Werte der sequentiellen Diglucosidase aus <i>Hevea brasiliensis</i> für Linustatin, Neolinustatin, Amygdalin und p-NPG; graphisch ermittelt nach Lineweaver-Burk und Hanes.....	93
Tabelle 10: Hemmbarkeit der sequentiellen Diglucosidase	96
Tabelle 11: Abnahme der Bindungsfähigkeit der Con A-Säule nach mehrfacher Applikation von Diglucosidase-Enzymlösungen.....	100
Tabelle 12: Abnahme der Stabilität der sequentiellen Diglucosidase bei den pH-Werten 8,0 und 8,5.....	101
Tabelle 13: Aktivitäten der simultanen Diglucosidase in Niedersalz-extrakten aus <i>Hevea</i> -Blättern	103
Tabelle 14: Aktivität der simultanen Diglucosidase aus <i>Davallia bullata</i> nach unterschiedlichen Aufarbeitungsmethoden	119
Tabelle 15: Aktivität der simultanen Diglucosidase in Aufarbeitungen aus <i>Davallia bullata</i> mit und ohne Zusatz von Proteaseinhibitoren.....	120

Tabelle 16: Einfluß potentieller Effektoren und Inhibitoren auf die Aktivität der simultanen Diglucosidase.....	122
Tabelle 17: Reinigung der simultanen Diglucosidase aus <i>Davallia bullata</i>	130

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

A. dest.	Destilliertes Wasser
AMPS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Rinder(Bovine)serumalbumin
β -CAS	β -Cyanoalanin-Synthase
ConA	Concanavalin A
DEAE	Diethylaminoethyl-
DTT	Dithiothreitol
DTE	Dithioerythritol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat (Natriumsalz)
FG	Frischgewicht
GC	Gaschromatographie
GOD	Glucose-Oxidase
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IE	Iodessigsäure
kDa	Kilodalton
n.b.	nicht bestimmt
nkat	nanoKatal
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAP	1-Phenyl-2,3-Dimethyl-4-Amino-Pyrazolon(5)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pI	isoelektrischer Punkt
p-NPG	p-Nitrophenyl- β -D-Glucosid
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon

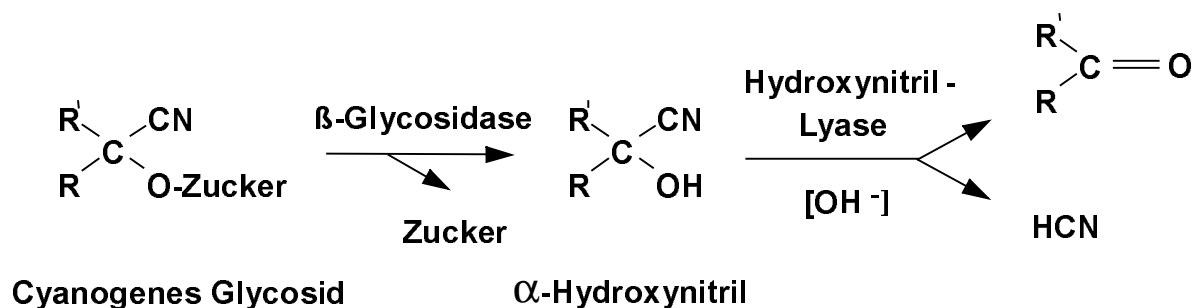
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SI	simultane Diglucosidase
SQ	sequentielle Diglucosidase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
Ü ₃₀	Enzymfraktion nach Zentrifugation des Rohhomogenats bei 30.000 x g
UV	Ultraviolett
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/w)	Masse (weight) pro Masse (weight)

1 Einleitung

Cyanogene Glycoside sind im Pflanzenreich weit verbreitet. Mehr als 70 verschiedene cyanogene Glycoside in über 3000 Arten sind beschrieben worden (Conn, 1991). Die chemische Struktur der cyanogenen Glycoside besteht aus α -Hydroxynitrilen¹, die mit einem oder mehreren Zuckerresten β -glycosyliert sind. Bei der enzymatischen Hydrolyse der cyanogenen Glycoside wird der Zuckeranteil durch β -Glycosidasen abgespalten (Conn, 1980; Poulton, 1990). Die entstandenen α -Hydroxynitrile sind unter physiologischen Bedingungen instabil und zerfallen spontan oder katalysiert durch eine Hydroxynitril-Lyase in eine Carbonylverbindung und die toxische Blausäure (Hösel, 1981).

In einigen Pflanzen werden cyanogene Glycoside in hohen Konzentrationen akkumuliert. Die ökologische Bedeutung dieser Pflanzeninhaltsstoffe liegt, aufgrund ihrer Giftigkeit und möglicherweise auch durch ihren bitteren Geschmack, in einer Abwehrfunktion ("Repellent") der Pflanze vor potentiellen Fraßfeinden (Herbivoren) (Nahrstedt, 1985; Proksch, 1991). Die Giftigkeit der cyanogenen Glycoside ist dabei unter anderem durch die Freisetzung von Blausäure bei einer Verletzung begründet. Diese Blausäurefreisetzung wird auch als Cyanogenese bezeichnet (Abbildung 1).

Abbildung 1: Reaktionsschema der pflanzlichen Cyanogenese



¹ Befindet sich ein Glucosemolekül als Zuckeranteil am Hydroxynitril, so werden die resultierenden Verbindungen als Glucoside bezeichnet. Bei zwei Glucoseresten erfolgt die analoge Beschreibung als Diglucosid.

Die Cyanogenese ist ein im Pflanzenreich weit verbreitetes Phänomen. Sie ist auch in bedeutenden Nutzpflanzen wie Hirse (*Sorghum bicolor* L.), Maniok (*Manihot esculenta* Crantz), Limabohne (*Phaseolus lunatus* L.), Bambus (*Bambusa vulgaris* Schrad) und Lein (*Linum usitatissimum* L.) nachgewiesen worden (Conn, 1991; Poulton, 1990; Nahrstedt, 1992).

Cyanogene Glykoside spielen also offenbar eine wichtige Rolle für Pflanzen in der Abwehr von Pathogenen und Fraßfeinden. Allerdings zeigten Lieberei et al. (1985) für den Kautschukbaum (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.), daß die Freisetzung von HCN nach Verletzung durch den parasitierenden Pilz *Microcyclus ulei* zur Schädigung des Pflanzengewebes und damit zu einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber dem Schädling führt.

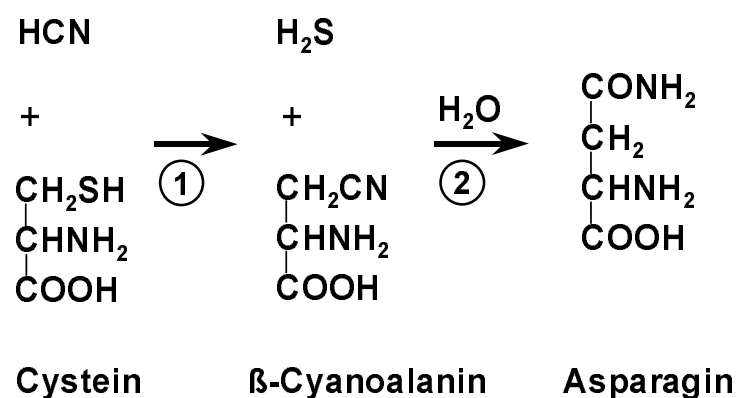
In intakten Pflanzen ist keine Cyanogenese zu beobachten. Die cyanogenen Glycoside werden getrennt von entsprechenden hydrolytischen Enzymen in der Vakuole akkumuliert, so daß eine enzymatische HCN-Freisetzung ausgeschlossen ist (Czapek, 1921; Robinson, 1930; Kojima et al., 1979; Gruhnert et al., 1994; Poulton und Li, 1994). Erst wenn es zu einer Aufhebung der Kompartimentierung durch Zerstörung von Zellen und Geweben kommt, erfolgt eine Hydrolyse der cyanogenen Glycoside, und Blausäure wird gebildet. Die Summe aller enzymatisch freisetzbaren, in einer Pflanze oder einem Gewebe vorhandenen cyanogenen Glycoside wird als HCN-Potential bezeichnet (Loyd und Gray, 1970).

Neben den Aspekten aus dem Bereich der biochemischen Ökologie haben die cyanogenen Glycoside noch eine weitere Bedeutung als Stickstoffspeicherstoffe bzw. Transportmetabolite. Bereits Nartey (1968) diskutierte, daß die cyanogenen Glycoside in *Manihot esculenta* in den aktiven Stoffwechsel einbezogen und dabei eng mit dem freien Aminosäurepool verbunden sind. Auch für *Sorghum bicolor* sind derartige Studien durchgeführt wurden (Adewusi, 1990). Bediako et al. (1981) konnten durch die Applikation radioaktiv markierter cyanogener Glycoside in *Manihot esculenta* zeigen, daß diese Stoffe nicht ausschließlich in denjenigen Geweben akkumuliert werden, in denen sie synthetisiert wurden. Dies ist auch für viele andere sekundäre Pflanzenstoffe bekannt. Das bedeutet, daß die cyanogenen Glycoside zum Teil einem Ferntransport, beispielsweise von einem Bildungs- in ein Speichergewebe, unterworfen sind. Dabei werden die

Gewebe entsprechend der Verlagerungsrichtung in "source-" und "sink"-Gewebe eingeteilt (Robinson, 1930; Clegg und Conn, 1979).

Zahlreiche Arbeiten zur Metabolisierung und zum Transport cyanogener Glycoside in Pflanzen wurden veröffentlicht. Bough und Gander (1971) sowie Adewusi (1990) wiesen den Turnover des cyanogenen Glucosides Dhurrin in *Sorghum*-Sämlingen nach. Abrol et al. (1966) und Nartey (1968) beschrieben den Abbau cyanogener Glycoside zu nicht cyanogenen Verbindungen. In Abbildung 2 ist dabei eine Möglichkeit zur Refixierung des Stickstoffs aus der freigesetzten Blausäure in Pflanzengewebe dargestellt (Blumenthal et al., 1963).

Abbildung 2: Fixierungsmechanismus für HCN über die β -Cyanoalanin-Synthase und die β -Cyanoalanin-Hydrolase



Zunächst wird die Cyanogruppe der durch Hydrolyse gebildeten Blausäure durch die β -Cyanoalanin-Synthase (in der Abbildung 2 mit Nr. 1 bezeichnet) an Cystein gebunden, und das entstandene β -Cyanoalanin wird durch die β -Cyanoalanin-Hydrolase (mit Nr. 2 bezeichnet) zu Asparagin umgewandelt. Dieses kann dann z. B. über Asparaginsäure in den Aminosäurestoffwechsel der Pflanze eingehen (Castric et al., 1972).

Clegg und Conn (1979) konnten zeigen, daß im Verlauf der Sämlingsentwicklung von *Phaseolus lunatus* die ursprünglich in den Kotyledonen akkumulierten cyanogenen Glycoside (bestimmt als HCN-Potential) abnehmen, während sie in den anderen Organen der sich entwickelnden Pflanze zunehmen. Dabei bleibt das HCN-Potential der Gesamtpflanze konstant. Bei diesen Untersuchungen wurde nicht nachgewiesen, ob Blausäure an die Umgebung abgegeben wurde. Der

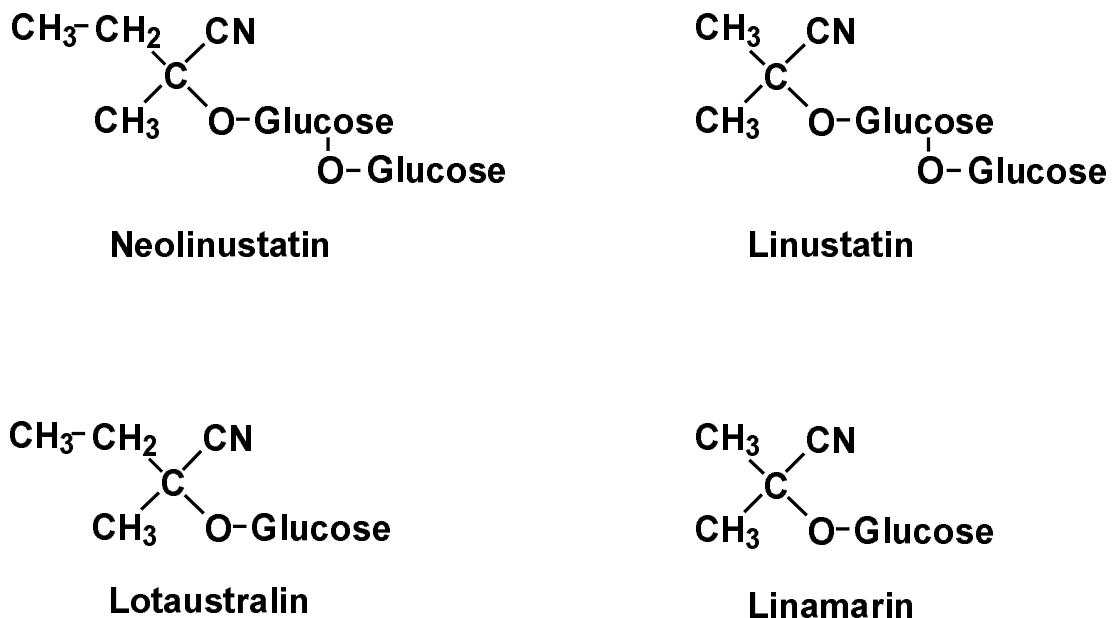
gleichbleibende Level an cyanogenen Glycosiden in der Pflanze kann dabei einerseits durch einen Transport der Stoffe von einem Gewebe zum anderen bedingt sein oder andererseits durch das gleichzeitige Auftreten einer Metabolisierung in einem Gewebe und der Neusynthese dieser Stoffe in einem anderen Gewebe. Lieberei (1984) und Selmar (1986) konnten für *Hevea brasiliensis* feststellen, daß tatsächlich eine Verlagerung cyanogener Glycoside während der Sämlingsentwicklung stattfindet. Dabei war die Abgabe von Blausäure an die Umgebung nicht nachweisbar.

Wie bei einigen anderen Pflanzen auch, wird bei der Sämlingsentwicklung von *Hevea brasiliensis* das Endosperm erheblich reduziert, während gleichzeitig die Kotyledonen vergrößert werden. Bei diesem Prozeß kommt es zur Verlagerung von Metaboliten, wobei während des Endosperm-Kotyledonen-Übergangs eine apoplastische Passage unabdingbar ist. Auch ein Langstreckentransport von Stoffen innerhalb einer Pflanze ist in der Regel mit einer apoplastischen Phloembeladung verbunden (Erickson, 1986). Bei *Hevea brasiliensis* liegen in bezug auf die cyanogenen Glucoside folgende anatomischen Voraussetzungen vor: Selmar (1982) und Gruhnert et al. (1994) konnten zeigen, daß sich die einzige in *Hevea* vorkommende β -Glucosidase (Linamarase) ausschließlich apoplastisch lokalisieren läßt. Mkpong et al. (1990) beschreiben ähnliche Verhältnisse bei *Manihot esculenta*. Bei einem direkten Langstreckentransport des in *Hevea brasiliensis* vorkommenden cyanogenen Monoglucosids Linamarin ist somit eine Verlagerung über den Apoplasten unmöglich, da der Zuckerrest sofort von der β -Glucosidase abgespalten wird, und eine Hydrolyse der Verbindung erfolgen würde. Selmar et al. (1988) konnten am Beispiel der Keimlinge von *Hevea* klären, wie dennoch eine Verlagerung cyanogener Glucoside z. B. vom Endosperm in die wachsenden Blätter möglich ist.

Im Endosperm unreifer *Hevea*-Samen des Wildtyps läßt sich hauptsächlich das cyanogene Monoglucosid Linamarin in hohen Konzentrationen nachweisen (Selmar et al., 1991). Während der Keimung nimmt das HCN-Potential in der gesamten Pflanze drastisch ab. Allerdings werden die im Endosperm gespeicherten cyanogenen Glucoside nicht im Speichergewebe, sondern in den wachsenden Organen des Sämlings in den Stoffwechsel eingeschleust. Um den Transport des

cyanogenen Monoglucosids Linamarin von den genetisch verschiedenen Geweben des Endosperms in die sich entwickelnde Pflanze trotz der apoplastisch vorkommenden β -Glucosidase (Linamarase) erklären zu können, wurde eine vor apoplastischer Hydrolyse geschützte Transportform des Linamarins postuliert (Selmar, 1989). Dieser "Transportmetabolit" ließ sich dementsprechend in Exsudaten des Endosperms und in Blattnektarien nachweisen (Selmar, 1986). Es handelt sich dabei um das cyanogene Diglucosid Linustatin, das neben Neolinustatin, Lotaustralin und Linamarin in *Hevea brasiliensis* vorkommt (Abbildung 3).

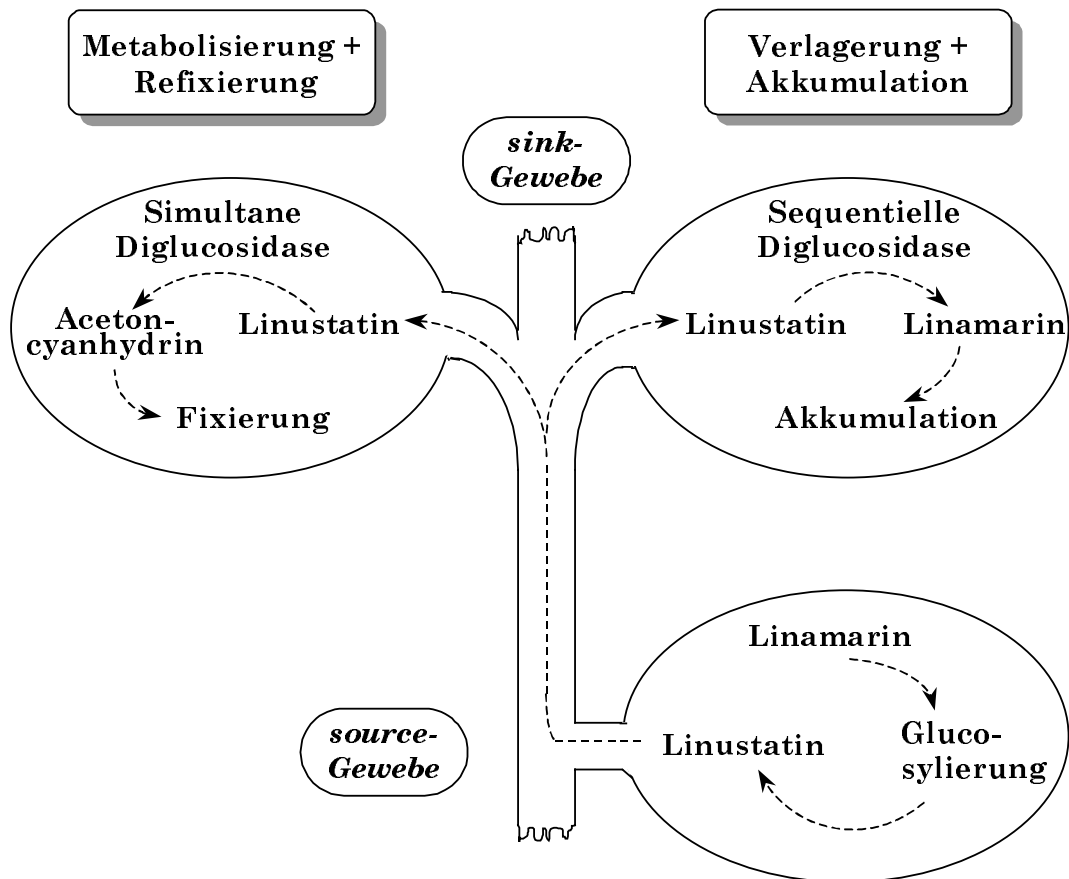
Abbildung 3: Cyanogene Mono- und Diglucoside in *Hevea brasiliensis*



Der entsprechende Stoffwechselweg cyanogener Glucoside in *Hevea brasiliensis* wurde von Selmar (1986) als "Linustatin-Weg" formuliert. Das Linustatin entsteht dabei direkt durch Glucosylierung aus dem Monoglucosid Linamarin (Selmar et al., 1987; Selmar, 1993). Das vom Endosperm exsudierte Diglucosid wird von den Kotyledonen aufgenommen, teilweise weitertransportiert und am Zielort von einer spezifischen Diglucosidase zu Acetoncyanhydrin und Gentioibiose hydrolysiert. Das unter physiologischen Bedingungen instabile Acetoncyanhydrin setzt Blausäure frei, die wie oben beschrieben in den allgemeinen Aminosäurepool der Pflanze eingeführt werden kann. Dieser Metabolisierungsweg stellt die von Selmar (1986) ursprünglich formulierte Form des "Linustatin-Wegs" dar. Die Untersuchungen zu Transportvorgängen cyanogener Glucoside

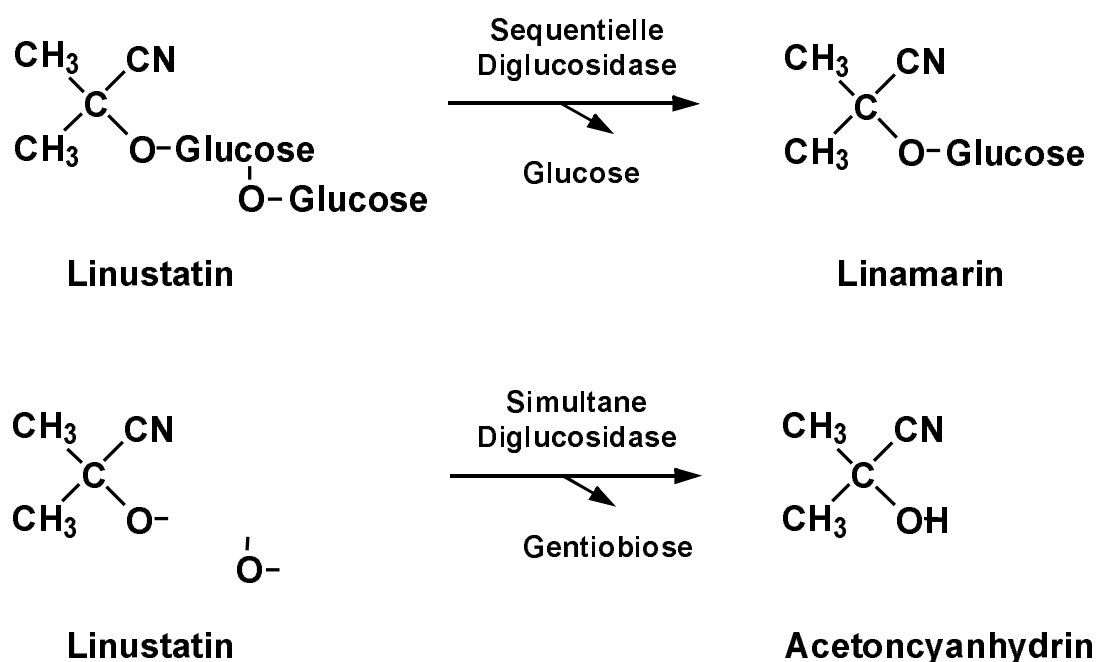
konnten durch die Applikation von ^{14}C -Linustatin an *Hevea*-Keimlinge erweitert werden. Selmar (1992) konnte zeigen, daß der Hauptanteil der applizierten Radioaktivität nach einer geringen Aufnahmezeit als Monoglucosid nachzuweisen war. Dabei wurde in den Keimblättern der Sämlinge nur ein kleiner Anteil zu nicht cyanogenen radioaktiv markierten Verbindungen umgesetzt. Auf der Basis dieser und weiterer Aufnahmestudien an *Hevea brasiliensis* wurde der erweiterte "Linustatin-Weg" von Selmar (1992) zur *in-vivo*-Metabolisierung und Verlagerung cyanogener Glucoside formuliert. Diese Vorgänge können z. B. von adulten Blättern oder von Endospermgewebe (*physiological source*) in sich entwickelnde Blätter bzw. in den Sämling (*physiological sink*) erfolgen. Dabei kann das Diglucosid Linustatin nach dem Transport innerhalb der Pflanze zwei unterschiedlichen Abbauprozessen unterworfen sein: erstens einem vollständigen Metabolisierungsschritt durch die Umwandlung zu nicht cyanogenen Verbindungen oder zweitens einer Abspaltung des terminalen Glucosemoleküls unter Freisetzung des ursprünglichen Monoglucosids Linamarin, welches somit nach der Verlagerung wieder in der Zelle akkumuliert werden kann (Abbildung 4).

Abbildung 4: Verlagerung und Metabolisierung des cyanogenen Diglucosids Linustatin in *Hevea*



Der Transportmetabolit Linustatin stellt somit einen Verzweigungspunkt im Stoffwechselweg der cyanogenen Glucoside in *Hevea* dar. Diese Substanz kann durch zwei katabolische Enzyme (Diglucosidasen) metabolisiert werden. Die unterschiedlichen Hydrolysemechanismen dieser Enzyme sind in Abbildung 5 dargestellt.

Abbildung 5: Spaltung von Linustatin durch Diglucosidasen



In dieser Arbeit wird eine sequentielle Diglucosidase (SQ) als das Enzym bezeichnet, welches das terminale Zuckermolekül eines cyanogenen Diglucosids abspaltet. Dabei kommt es zur Bildung des entsprechenden Monoglucosids und des Zuckers. Als Produkte der Hydrolyse eines cyanogenen Diglucosids durch eine simultane Diglucosidase (SI) sind hingegen das entsprechende Cyanhydrin und ein Disaccharid nachzuweisen.

In der Literatur wurden bisher die folgenden Diglucosidasen beschrieben: Fan und Conn (1985) bzw. Kuroki und Poulton (1986) reinigten und charakterisierten eine Linustatinase aus *Linum usitatissimum* bzw. zwei Amygdalin-Hydrolasen aus *Prunus serotina*. Diese Enzyme hydrolysieren cyanogene Diglucoside durch Abspalten des jeweiligen terminalen Zuckerrestes zum entsprechenden Monoglucosid. Auf der Grundlage einer mechanistischen Betrachtung wurden diese Enzyme als sequentiell spaltende Diglucosidasen bezeichnet (Kuroki et al., 1984). Kuroki et al. (1984) beschreiben außerdem in dem Farn *Davallia trichomanoides* eine Vicianin-Hydrolase, die das Diglycosid Vicianin gemäß eines simultanen Mechanismus hydrolysiert. Die Funktion dieser beschriebenen Enzyme wurde dabei nur im Rahmen der verletzungsbedingten Cyanogenese zur Freisetzung von Blausäure aus cyanogenen Diglucosiden gesehen.

In *Hevea brasiliensis* konnte Selmar (1986 und 1992) in unterschiedlichen Homogenaten aus Blättern sowohl die Aktivität einer simultanen als auch die einer sequentiellen Diglucosidase nachweisen. Damit kommen in den Blättern einer Pflanze zwei Enzyme vor, die in bezug auf ein Substrat die gleiche oder ähnliche Spezifität jedoch unterschiedliche Spaltungsmechanismen aufweisen. Die Hydrolyse des Diglucosids Linustatin stellt – wie oben angemerkt – einen wichtigen Verzweigungspunkt im Stoffwechsel der cyanogenen Glucoside in *Hevea brasiliensis* dar. Abhängig von den im jeweiligen Pflanzengewebe vorhandenen katabolischen Diglucosidasen, verbleiben die entsprechenden Metaboliten der cyanogenen Glucoside nach dem Transport entweder weiterhin im Sekundärstoffwechsel (Spaltung durch die sequentielle Diglucosidase), oder sie treten in den Primärstoffwechsel ein (Spaltung durch die simultane Diglucosidase). Im ersten Fall resultiert eine einfache Verlagerung der cyanogenen Glucoside z. B. in sich entwickelnde, junge Gewebe, um dort eine "Repellent-Funktion" ausüben zu können. Im zweiten Fall findet eine Hydrolyse bis zur Blausäure statt, die dann in den Aminosäurestoffwechsel eingeschleust werden könnte. In diesem Fall würde der in den cyanogenen Glucosiden gespeicherte Stickstoff in den allgemeinen Stickstoffpool der Pflanze übergehen und dort für die Synthese anderer stickstoffhaltiger Verbindungen zur Verfügung stehen (Selmar, 1992).

Diese beschriebenen Verlagerungs- und Metabolisierungsvorgänge finden vermutlich besonders in sich entwickelnden Geweben (z. B. Blattaustrieb oder Sämlingsentwicklung von *Hevea brasiliensis*) statt. Durch die Bestimmung der unterschiedlichen Expressionsmuster der beiden Diglucosidasen in sich entwickelnden Blättern bzw. Sämlingen von *Hevea*, wäre es möglich, diese Frage vor dem Hintergrund des "Linustatin-Wegs" zu klären. Durch die proteinchemische Aufreinigung und Charakterisierung dieser Enzyme aus *Hevea brasiliensis* mit einer anschließenden Produktion von Antikörpern, könnten z. B. die Enzyme im Pflanzengewebe lokalisiert werden. Des weiteren könnte ein Immunscreening rekombinanter DNA-Klone nach Expression gemacht werden, um wichtige molekularbiologische Grundlagenarbeiten zur Vertiefung des "Linustatin-Wegs" durchzuführen.

Das Ziel dieser Arbeit war, die sequentielle Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* bis zur Homogenität zu reinigen und biochemisch zu charakterisieren. Zusätzlich sollten die Aktivitäten der sequentiellen und der simultanen Diglucosidase in Abhängigkeit von der Blatt- bzw. Sämlingsentwicklung beschrieben werden. Die simultane Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* konnte nicht mit proteinchemischen Methoden gereinigt werden, da die Aktivität sehr großen Schwankungen unterworfen war. Aus diesem Grund wurde die Aufreinigung bis zur Homogenität und die Charakterisierung einer simultanen Diglucosidase aus den Wedeln des Farns *Davallia bullata* durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

Für die Enzympräparationen wurden Blätter und Samen bzw. Sämlinge des Kautschukbaumes *Hevea brasiliensis* verwendet. In den genannten Geweben wurde die Aktivität einer sequentiellen und einer simultanen Diglucosidase untersucht. Aus den Blättern von *Hevea brasiliensis* wurde eine sequentielle Diglucosidase aufgereinigt. Die Wedel des Farns *Davallia bullata* wurden zur Reinigung einer simultanen Diglucosidase verwendet.

2.1.1 *Hevea brasiliensis*

Für die Untersuchungen wurden sowohl sich entwickelnde Samen bzw. Sämlinge als auch ein- bis fünfjährige Pflanzen von *Hevea brasiliensis* (Wildtyp) eingesetzt. Außerdem wurden die definierten Klone FX 3864 und FX 2261 verwendet. Durch den Einsatz von genetisch unterschiedlichem Material wurde gewährleistet, daß die Ergebnisse dieser Arbeit eine allgemeingültige Aussage über den Stoffwechsel der cyanogenen Glucoside in *Hevea brasiliensis* zulassen.

2.1.1.1 Definition der Blattstadien von *Hevea brasiliensis*

Die Einteilung der Blattstadien entspricht der Definition von Lieberei (1984) (Tabelle 1). Abweichend davon wurde in dieser Arbeit auf eine weitere Unterteilung des Stadiums A in die Untergruppen A₁ und A₂ verzichtet.

Tabelle 1: Definition der Blattstadien von *Hevea brasiliensis* nach Lieberei (1984)

Blattstadium	Beschreibung
A	< 2 cm, rotbraun, glänzend, Blätter sind nach oben gerichtet, stark turgeszent
B ₁	> 2 cm, rotbraun, stark glänzend, Blätter sind abwärts gerichtet, stark turgeszent
B ₂	2 – 10 cm, oliv-grün, glänzend, Blätter hängen abwärts
C	> 10 cm, gelb-grün, matt, Blätter sind sehr weich und hängen senkrecht herab
D	adulte Blätter, dunkelgrün, fest

Für die durchgeführten Untersuchungen wurden die Blätter sofort nach der Ernte mit flüssigem Stickstoff zerkleinert, über mehrere Wochen gesammelt und bei – 70 °C gelagert.

2.1.1.2 Blattmaterial

Für die Enzympräparationen wurden Blätter der Stadien B – C ohne Blattstiele verwendet. Die Kultivierung der Pflanzen erfolgte im Gewächshaus mit ausreichender Belüftung und zusätzlicher Beleuchtung (Halogenmetall dampflampen vom Typ HQI – 400 W (Fa. Osram), Strahlungsintensität in Wuchshöhe: 150 µE/s x m²). Es wurden Langtagbedingungen (14/10 Stunden) gewählt. Die Temperatur betrug 25 °C mit einer relativen Luftfeuchtigkeit von 80 – 90 %.

2.1.1.3 Samen

Die Kautschuksamen (*Hevea brasiliensis*) wurden von der CEPLAC (Comissao executiva Do Plano da Lavoura Cacaueira, Brasilien) zur Verfügung gestellt. Die verwendeten Samen entstammten den Klonen FX 3864 und FX 2261.

2.1.1.4 Sämlingsanzucht

Zur Erleichterung der Keimung wurde die harte Samenschale der gewaschenen *Hevea*-Samen mit einer Zange entfernt. Die Samen wurden zur Keimung bei 28 °C auf feuchtem Vermiculite (Deutsche Vermiculite Dämmstoff GmbH, 44549 Spröckhövel) in Plastikschaalen ausgelegt, die mit lichtdurchlässiger Kunststoffolie abgedeckt waren.

Die Temperatur im Anzuchtsraum betrug 26 °C und die Luftfeuchtigkeit unter der Kunststoffabdeckung je nach Belüftung 80 – 90 %. Als Beleuchtungsquelle dienten Halogenmetalldampflampen vom Typ HQI – 400 W (Fa. Osram). Die Strahlungsintensität in Wuchshöhe betrug 150 $\mu\text{E/s} \times \text{m}^2$. Der Tag- und Nachtrhythmus entsprach mit 14/10 Stunden Langtagbedingungen. Etwa drei Wochen nach Keimungsbeginn wurden die jungen Sämlinge in Erde gepflanzt und entsprechend Kapitel 2.1.1.2 weiterkultiviert.

2.1.2 *Davallia bullata*

Die Arbeiten zur Reinigung und Charakterisierung der simultanen Diglucosidase wurden mit adulten Wedeln des Farns *Davallia bullata* durchgeführt. Die Pflanzen wurden über den Blumenfachhandel (Fa. Volk, Braunschweig) bezogen. Die weitere Kultivierung der Pflanzen erfolgte im Gewächshaus unter Langtagbedingungen (14/10 Stunden) bei einer Temperatur von 22 – 24 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 60 – 70 %. Die Beleuchtungsquelle entsprach den Bedingungen des Kapitels 2.1.1.2.

2.2 Enzympräparationen

Alle Präparationen wurden bei 0 – 4 °C durchgeführt. Die Lagerung der Enzympräparate erfolgte bei – 18 °C.

2.2.1 Herstellung eines Enzymrohextraktes aus *Hevea*-Blättern

Für die Herstellung eines Enzymrohextraktes aus *Hevea*-Blättern wurden die jungen Blätter der Stadien B₁, B₂ und C verwendet (Definition siehe Tabelle 1). Die geernteten *Hevea*-Blätter wurden in einem Mörser mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und zerrieben.

2.2.1.1 Niedersalzproteinextrakt

Nach Gewichtsbestimmung wurde das Blattpulver mit hypotonischem Medium (Phosphat-/Citrat-(McIlvaine)-Puffer 40 mM; pH 5,6; 2 mM Natriumascorbat als Antioxidanz) in einem Verhältnis von Puffer zu Frischgewicht von ca. 7:1 (v/w) versetzt. Die Homogenisation erfolgte für dreimal 45 sec mit einem Ultra Turrax. Anschließend wurde das Homogenat durch ein Nylonnetz und vier Lagen eines Baumwolltuches filtriert. Das Filtrat wurde eine Stunde bei 30.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde nach Entfernen der niedermolekularen Stoffe (siehe Kapitel 2.2.2) zur Aktivitätsbestimmung der simultanen Diglucosidase verwendet.

2.2.1.2 Hochsalzproteinextrakt

Der Homogenisationsrückstand des Niedersalzextraktes wurde im Extraktionsmedium (McIlvaine-Puffer 40 mM; pH 5,6; 2 mM Natriumascorbat als Antioxidanz) resuspendiert, erneut homogenisiert und entsprechend Kapitel 2.2.1.1 abfiltriert. Dieser Vorgang wurde 5 – 7 mal wiederholt, bis das Filtrat fast farblos war. Der resuspendierte Zellwandrückstand wurde anschließend mit Extraktionsmedium, welches 1,2 M Natriumchlorid enthielt, eine Stunde bei 4 °C extrahiert. Die zähflüssige Masse wurde entsprechend Kapitel 2.2.1.1 unter Zugabe von Extraktionsmedium filtriert. Das Filtrat wurde eine Stunde bei 30.000 x g zentrifugiert. Der Überstand (\dot{U}_{30}) wurde nach dem Entfernen der niedermolekularen Stoffe (siehe Kapitel 2.2.2) für die Aktivitätsbestimmungen der sequentiellen Diglucosidase eingesetzt, da sich dort die Hauptaktivität nachweisen ließ, während sich im Sediment der Zentrifugation weniger als 5 % der Enzymaktivität fanden.

2.2.2 Herstellung eines Enzymrohextraktes aus Samen und Sämlingen von *Hevea brasiliensis*

Zur Bestimmung der Aktivitäten der sequentiellen und der simultanen Diglucosidase in den einzelnen *Hevea*-Samenbestandteilen (Varietät: FX 3864 und FX 2261) wurden jeweils dreimal fünf Samen bzw. Sämlinge der unterschiedlichen Entwicklungsstadien zusammengefaßt. Die einzelnen Bestandteile

(Endosperm, Kotyledonen, Wurzel, Sproß und Blätter) wurden vorsichtig präpariert und die einzelnen Organe vereinigt. Für die Herstellung eines Enzymrohextraktes wurden die *Hevea*-Samen der Samenstadien 0 – VI verwendet (siehe Abbildung 22, Seite 109; Definition der Samenstadien nach Lieberei, 1984). Die Nieder- und Hochsalzproteinextrakte wurde entsprechend Kapitel 2.2.1 hergestellt. In den erhaltenen Proteinextrakten wurde jeweils eine Proteinbestimmung (siehe Kapitel 2.9.1) durchgeführt. Falls notwendig, wurden die Rohextrakte für die Aktivitätsbestimmung der sequentiellen und der simultanen Diglucosidase mit Hilfe von Konzentratoren (Centriprep 30[®], Trenngrenze: 30.000 Dalton, Fa. Amicon) eingeengt.

Die niedermolekularen Bestandteile (Phenole, cyanogene Glucoside, usw.) der entsprechenden Enzymextrakte stören die Aktivitätsbestimmungen der sequentiellen und der simultanen Diglucosidase. Dazu wurden die niedermolekularen Stoffe der eingeengten Extrakte und der nach Kapitel 2.2.1.1 und 2.2.1.2 hergestellten Proteinlösungen über eine kleine Gelfiltrationssäule (PD-10 Columns[®], Sephadex G-25[®], Fa. Pharmacia) abgetrennt. Bei einem auf die Säule applizierten Probenvolumen von 2,5 mL wurde mit 3,5 mL des jeweiligen Inkubationspuffers eluiert.

2.2.3 Herstellung eines Enzymrohextraktes aus Wedeln des Farnes

Davallia bullata

Für die Herstellung eines Enzymextraktes aus Wedeln des Farnes *Davallia bullata* wurde ausschließlich adultes Pflanzenmaterial eingesetzt. Die geernteten Farnwedel wurden in einem großen Mörser mit einer Schere zerkleinert und nach Zugabe einer geringen Menge an Glasperlen (Glass Beads[®] 425-600 microns, Fa. Sigma) unter Zusatz von flüssigem Stickstoff feinst gemörsert. Parallel dazu wurde ein Imidazol/HCl-Puffer (0,1 M; pH 6,0) mit 50 % (w/w) Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) des eingesetzten Frischgewichtes an Farnwedeln 10 min lang quellen gelassen. Diese gequollene Masse wurde dem Inhalt des Mörsers zugesetzt und unter Reiben intensiv vermengt. Das Verhältnis von Frischgewicht zu eingesetztem Puffer betrug 1:10 (w/v). Nachdem der Inhalt des Mörsers aufgetaut war, wurden weitere 100 mL des Imidazol/HCl-Puffers (0,1 M;

pH 6,0) zugesetzt und mit Hilfe des Pistills intensiv homogenisiert. Das Homogenat wurde durch ein Nylonnetz, welches sich auf vier Lagen eines Baumwolltuches befand, filtriert. Der Filterrückstand wurde mit Imidazol/HCl-Puffer (0,1 M; pH 6,0) gewaschen und erneut abfiltriert. Die vereinigten Filtrate wurden eine Stunde bei 30.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und durch Filtration durch einen Faltenfilter (Schleicher & Schüll®) von aufgewirbelten Sedimentpartikeln befreit. Die klare Lösung wurde mittels Konzentratoren (Centriprep 30®, Trenngrenze: 30.000 Dalton, Fa. Amicon) eingeeengt.

Wie unter Kapitel 2.2.2 beschrieben, wurden die niedermolekularen Bestandteile der Proteinlösungen entfernt. Die Elution der Proben erfolgte hierbei mit Imidazol/HCl-Puffer (0,1 M; pH 6,0).

2.3 Reinigung der sequentiellen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis*

Alle Experimente zur Reinigung der sequentiellen Diglucosidase erfolgten bei 0 – 4 °C. Die Enzympräparate wurden bei – 18 °C gelagert.

2.3.1 80 %ige Ammoniumsulfatfällung

Ausgangsmaterial für die Reinigung der sequentiellen Diglucosidase waren die entsprechend Kapitel 2.2.1.2 hergestellten Hochsalzproteinextrakte. Die abzentrifugierte Proteinlösung (Ü₃₀) wurde unter Rühren mit fein gemörsertem Ammoniumsulfatpulver bis zur 80 %igen Sättigung versetzt. Dabei wurde auf pH-Konstanz geachtet, gegebenenfalls wurde ein zu niedriger pH-Wert durch die Zugabe von NaOH korrigiert. Um eine vollständige Präzipitation der Proteine zu gewährleisten, wurde die Lösung nach Zugabe von (NH₄)₂SO₄ noch eine Stunde gerührt und dann zwei Stunden ruhig stehen gelassen. Die gefällten Proteine wurden 45 min lang bei 30.000 x g abzentrifugiert. Das Sediment wurde mit McIlvaine-Puffer (150 mM; pH 5,6) aufgenommen und gegen das 700-fache Volumen einer 1,2 M NaCl-Lösung (mit 10 mM Phosphat; pH 6,8; 2 mM Natriumascorbat) 12 Stunden lang dialysiert. Der Zusatz des Natriumchlorids im Dialysepuffer war notwendig, um ein Binden der sequentiellen Diglucosidase an die Dialysemembran (Kapitel 3.2, Punkt 3.) zu verhindern. Das Dialysat wurde

bei 30.000 x g 30 min lang abzentrifugiert, um die nicht gelösten Proteine abzutrennen.

2.3.2 Gelfiltration mit Superdex 200[®]

Zur weiteren Reinigung der sequentiellen Diglucosidase wurden die Proteine der konzentrierten Hochsalzproteinlösung (Kapitel 2.3.1) über eine Superdex 200[®]-Gelfiltrationssäule chromatographisch aufgetrennt. Folgende Bedingungen wurden verwendet:

Säulenkörper: Länge 60 cm, Durchmesser 1,6 cm

Säulenvolumen: 120 mL

Säulenmaterial: Superdex 200[®] (Fa. Pharmacia)

Chromatographiepuffer: McIlvaine-Puffer (15 mM; pH 5,6;
100 mM NaCl)

Fluß: 0,6 mL/min

Fraktionsvolumen: 4 mL

Die Entwicklung der Säule erfolgte durch den Chromatographiepuffer in einer Fließrichtung von oben nach unten mit Hilfe einer Pumpe, wobei die Detektion der Proteine kontinuierlich in einer Durchflußküvette durch die Messung der Extinktion bei 280 nm verfolgt wurde. Die Enzymaktivität der sequentiellen Diglucosidase wurde durch die Inkubation der einzelnen aufgefangenen Fraktionen mit den Substraten Amygdalin (Standardinkubationsansatz, siehe Kapitel 2.7.2) bzw. p-Nitrophenyl- β -D-glucosid (Standardinkubationsansatz, siehe Kapitel 2.7.2.4) bestimmt. Die Enzymfraktionen mit den höchsten Aktivitäten wurden vereinigt, mit Centriprep 30[®]-Konzentratoren eingeeengt und auf den Chromatographiepuffer der Kationenaustauscherchromatographie (20 mM Natriumacetat /HCl; pH 5,0) umgepuffert.

2.3.3 Kationenaustauscherchromatographie mit CM Bio-Gel A[®]

Die umgepufferten und konzentrierten Fraktionen der Gelfiltration (Kapitel 2.3.2), die eine sequentielle Diglucosidase enthielten, wurden auf eine CM Bio-

Gel A-Agarose[®]-Kationenaustauschersäule appliziert. Folgende chromatographische Bedingungen wurden verwendet:

Säulenkörper: Länge 14 cm, Durchmesser 1,6 cm

Säulenvolumen: 15 mL

Säulenmaterial: CM Bio-Gel A-Agarose[®] (Fa. BIORAD)

Startpuffer: 20 mM Natriumacetat/HCl; pH 5,0

Elutionspuffer: 1 M Lithiumchlorid in 20 mM
Natriumacetat/HCl; pH 5,0

Gradient: nach 770 min, 30 % Elutionspuffer

Fluß: 0,3 mL/min

Fraktionsvolumen: 2 mL

Die Bestimmung der Enzymaktivität der sequentiellen Diglucosidase erfolgte durch die Inkubation der einzelnen Fraktionen mit den Substraten Amygdalin (Standardinkubationsansatz, siehe Kapitel 2.7.2) bzw. p-Nitrophenyl- β -D-glucosid (Standardinkubationsansatz, siehe Kapitel 2.7.2.4). Die Enzymfraktionen mit den höchsten Aktivitäten wurden vereinigt, mit Centriprep 30[®]- bzw. Microcon 30[®]-Konzentratoren (Fa. Amicon) eingengt und auf den 1:10 (v/v) verdünnten Elektrophoresepuffer (35 mM β -Alanin; 14 mM Essigsäure; pH 4,5) der präparativen nativen kationischen Gelelektrophorese umgepuffert.

2.3.4 Präparative native kationische Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die vereinigten, aktiven Fraktionen der Kationenaustauschersäule (Kapitel 2.3.3) wurden als abschließendem Reinigungsschritt einer präparativen nativen kationischen Gelelektrophorese unterzogen. Diese Gelelektrophorese wurde in einer Mini Prep Cell[®]-Apparatur (Fa. BIORAD) nach einer Vorschrift von Rothe (1994) durchgeführt. Das Trenngel hatte einen Durchmesser von 7 mm und eine Höhe von 5 cm. Die Trennzeit betrug 10 Stunden, bei einer angelegten Spannung von 150 V und einer Stromstärke von 7 mA.

Für die Herstellung des Trenngels wurden folgende Lösungen verwendet:

	Trenngel
30 % Acrylamid/Bis (30:0,8)	1 mL
Kaliumhydroxid (480 mM); Essigsäure (3 M); TEMED (267 mM); pH 4,3	0,5 mL
H ₂ O	0,5 mL
AMPS (12,2 mM)	2 mL

Das Trenngel wurde über Nacht polymerisiert. Die Acrylamidkonzentration im Trenngel betrug 7,7 %. Die auf den verdünnten Elektrophoresepuffer umgepufferte Probe wurde auf eine Glycerinkonzentration von 20 % eingestellt. Da ein Trennsystem ohne Sammelgel gewählt wurde, mußte die Probe so konzentriert wie möglich eingesetzt werden. Als Elektrodenpuffer wurde die folgende Lösung verwendet: 350 mM β -Alanin; 140 mM Essigsäure; pH 4,5.

Durch einen kontinuierlichen Fließmittelstrom wurden die aus dem Gel wandernden Proteine eluiert. Die Flußgeschwindigkeit des Fließmittels betrug 0,1 mL/min. Die Fraktionen hatten ein Volumen von 250 μ L. Die Bestimmung der Enzymaktivität der sequentiellen Diglucosidase erfolgte durch die Inkubation von 10 μ L dieser Fraktionen mit 50 μ L einer 15 mM p-Nitrophenyl- β -D-glucosid-Lösung (150 mM McIlvaine-Puffer; pH 5,6) bei 30 °C im Trockenschrank in abgedeckten Mikrotiterplatten. Nach einer Inkubationsdauer von 9 Stunden wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 100 μ L einer eisgekühlten 0,07 M Natriumcarbonat-Lösung abgestoppt. Zusätzlich wurde die Enzymaktivität der Fraktionen gegenüber dem cyanogenen Diglucosid Linustatin bestimmt. Dazu wurden 150 μ L der aufgefangenen Fraktionen mit 50 μ L einer 0,2 molaren Na₂HPO₄-Lösung auf einen pH-Wert von 5,5 umgepuffert, anschließend wurden 200 μ L einer Linustatinlösung (6 mM in 150 mM McIlvaine-Puffer; pH 5,6) in den Reaktionsraum eines Thunberggefäßes hinzugefügt. Die Reaktion wurde 5 Stunden lang bei 30 °C im Wasserbad inkubiert und mit 0,1 mL 1 N NaOH aus der Seitenbirne des Reaktionsgefäßes abgestoppt. Die Bestimmung der freigesetzten Glucosemenge erfolgte wie unter Kapitel 2.7.2.2 angegeben. Die aktiven Fraktionen der sequentiellen Diglucosidase wurden mit

einer SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese auf ihre Reinheit und Homogenität hin untersucht (Kapitel 2.5.4).

2.4 Reinigung der simultanen Diglucosidase aus *Davallia bullata*

Alle Experimente zur Reinigung der simultanen Diglucosidase wurden bei 0–4 °C durchgeführt. Die Enzympräparate wurden bei – 18 °C gelagert.

2.4.1 Immobilisierte Metall-Ionen Affinitätschromatographie

Die über Konzentratoren eingeeengte Proteinlösung des Rohhomogenates (Kapitel 2.2.3) wurde zur Reinigung der simultanen Diglucosidase mittels einer Chelating Sepharose High Performance[®]-Säule mit (Ni²⁺ als Metallionen) chromatographisch aufgetrennt. Folgende Bedingungen wurden gewählt:

Säulenkörper: Länge 4 cm, Durchmesser 1,6 cm

Säulenvolumen: 5 mL

Säulenmaterial: Chelating Sepharose High Performance[®]
(Fa. Pharmacia), beladen mit Ni²⁺-Ionen

Konditionierungspuffer: 0,1 M NiSO₄-Lösung, konditionieren der
Säule mit fünffachem Säulenvolumen, waschen
mit zehnfachem Startpuffer

Startpuffer: 0,1 M Natriumacetat/HCl; pH 7,3
mit 0,5 M Natriumchlorid

Waschen: mit Startpuffer bis zum dreifachen Säulenvolumen

Elutionspuffer: 0,1 M Natriumacetat/HCl; pH 3,0
mit 0,5 M Natriumchlorid

Gradient: in 40 min, 100 % Elutionspuffer

Fluß: 0,75 mL/min

Fraktionsvolumen: 1 mL

Die Detektion der Proteine erfolgte kontinuierlich in einer Durchflußküvette durch die Messung der Extinktion bei 280 nm. Die Bestimmung der Enzymaktivität der simultanen Diglucosidase erfolgte durch die Inkubation der einzelnen Fraktionen mit dem Substrat Amygdalin (Standardinkubationsansatz, siehe Kapitel 2.7.1). Die Enzymfraktionen mit den höchsten Aktivitäten wurden vereinigt, mit Centriprep 30[®]-Konzentratoren eingeeengt und auf den Chromatographiepuffer der Anionenaustauscherchromatographie (20 mM Imidazol/HCl; pH 6,0) über PD-10-Säulen umgepuffert.

2.4.2 DEAE-Sephacel[®]-Anionenaustauscherchromatographie

Die auf den Startpuffer umgepufferten und konzentrierten Fraktionen der immobilisierten Metall-Ionen Chromatographie (Kapitel 2.4.1) wurden auf eine DEAE-Sephacel[®]-Anionenaustauschersäule appliziert. Folgende chromatographische Bedingungen wurden gewählt:

Säulenkörper: Länge 10 cm, Durchmesser 1,6 cm

Säulenvolumen: 5 mL

Säulenmaterial: DEAE-Sephacel[®] (Fa. Sigma)

Startpuffer: 20 mM Imidazol/HCl; pH 6,0

Waschen: mit Startpuffer bis zum vierfachen Bettvolumen

Elutionspuffer: 1 M Natriumchlorid in 20 mM Imidazol/HCl; pH 6,0

Gradient: in 250 min, 100 % Elutionspuffer

Fluß: 0,3 mL/min

Fraktionsvolumen: 2,5 mL

Die Detektion der Proteine erfolgte kontinuierlich in einer Durchflußküvette durch die Messung der Extinktion bei 280 nm. Die Bestimmung der Enzymaktivität der simultanen Diglucosidase erfolgte durch die Inkubation der einzelnen Fraktionen mit dem Substrat Amygdalin (Standardinkubationsansatz, siehe Kapitel 2.7.1). Die Enzymfraktionen mit den höchsten Aktivitäten wurden vereinigt, mit Centriprep 30[®]-Konzentratoren eingeeengt und auf den Chromato-

graphiepuffer der Hydroxyapatit-Säule (0,001 M Kaliumphosphat; pH 7,2) über PD-10-Säulen umgepuffert.

2.4.3 Chromatographie mit Hydroxyapatit

Beim Umgang mit dem Säulenmaterial Hydroxyapatit (in kleinen Fertigsäulen der Fa. BIORAD: Econo-Pac CHT-II®) sind einige Besonderheiten bei der Konditionierung der Säule zu beachten. Die folgenden Parameter eigneten sich dazu am besten:

1. Waschen mit 3 mL 0,001 M Kaliumphosphat-Lösung; pH 7,2
2. Waschen mit 6 mL 0,05 M Kaliumphosphat-Lösung; pH 6,8
3. Waschen mit 10 mL 0,001 M Kaliumphosphat-Lösung; pH 7,2

Nach der Konditionierung der Säule wurde die Probe (Kapitel 2.4.2) aufgetragen. Folgende chromatographischen Parameter wurden gewählt:

Säulenkörper: Länge 4 cm, Durchmesser 0,5 cm

Säulenvolumen: 1 mL

Säulenmaterial: Macro Ceramic Hydroxyapatit® (Fa. BIORAD)

Startpuffer: 0,001 M Kaliumphosphat-Lösung; pH 7,2

Waschen: mit Startpuffer bis zum achtfachen Bettvolumen

Elutionspuffer: 0,1 M Kaliumphosphat-Lösung; pH 6,8

Gradient: in 240 min, 100 % Elutionspuffer

Fluß: 0,3 mL/min

Fraktionsvolumen: 2,5 mL

Die Detektion der Proteine erfolgte kontinuierlich in einer Durchflußküvette durch die Messung der Extinktion bei 280 nm. Die Bestimmung der Enzymaktivität der simultanen Diglucosidase erfolgte durch die Inkubation der einzelnen Fraktionen mit dem Substrat Amygdalin (Standardinkubationsansatz, siehe Kapitel 2.7.1). Die Enzymfraktionen mit den höchsten Aktivitäten wurden vereinigt, mit Microcon 30®-Konzentratoren eingeeengt und auf den Probenpuffer

(0,025 M Tris; 0,19 M Glycin; 50 % Glycerin; 10 % Bromphenolblau) der präparativen nativen anionischen Polyacrylamid-Gelelektrophorese umgepuffert.

2.4.4 Präparative native anionische Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die von der Hydroxyapatitsäule (Kapitel 2.4.3) eluierten, an sequentieller Diglucosidase aktiven Fraktionen wurden eingengt und als abschließendem Reinigungsschritt einer präparativen nativen anionischen diskontinuierlichen Gelelektrophorese unterzogen. Diese Gelelektrophorese wurde in einer Mini Prep Cell®-Apparatur (Fa. BIORAD) nach einer Vorschrift von Laemmli (1970) ohne Zusatz von SDS durchgeführt. Das Trenn- bzw. Sammelgel hatte einen Durchmesser von 7 mm und eine Höhe von 5 cm bzw. 1 cm. Bei einer angelegten Spannung von 250 V und einer Stromstärke von 3 mA betrug die Trennzeit 12 Stunden.

Für die Herstellung des Trenn- bzw. Sammelgels wurden folgende Lösungen verwendet:

	Trenngel	Sammelgel
40 % Acrylamid/Bis (40:1,2)	3,1 mL	0,625 mL
Tris/HCl (1,5 M); pH 8,8	6,3 mL	–
Tris/HCl (0,5 M); pH 6,8	–	0,625 mL
H ₂ O	7,166 mL	3,7 mL
AMPS (10 %ig)	0,133 mL	0,05 µL
TEMED	13 µL	2,5 µL

Die Acrylamidkonzentration im Trenngel betrug 7,5 %, und es wurde über Nacht polymerisiert. Die auf den verdünnten Elektrophoresepuffer umgepufferte und eingengte Probe (Kapitel 2.4.3) wurde mit 100 µL des folgenden Puffers 1:2,5 (v/v) verdünnt: 0,15 mL Tris/HCl (0,5 M); pH 6,8; 0,5 mL Glycerin; 0,25 mL einer 1 %igen Bromphenolblaulösung und 0,1 mL Wasser. Als Elektrodenpuffer wurde folgende Lösung verwendet: 0,025 M Tris; 0,19 M Glycin und 0,1 % SDS. Um das Enzym während seiner Verweildauer im Gelsystem zu stabilisieren, wurde als Elutionspuffer für die simultane Diglucosidase ein 0,1 M Imidazol/HCl-Puffer

(pH 6,0) eingesetzt. Die Flußgeschwindigkeit des Elutionspuffers betrug 0,1 mL/min. Die von der präparativen Gelelektrophorese eluierten und anschließend gesammelten Fraktionen hatten ein Volumen von je 100 µL. Die Aktivität der simultanen Diglucosidase gegenüber dem Substrat p-Nitrophenyl- β -D-glucosid (p-NPG) beträgt nur 7 % verglichen mit der Aktivität des Enzyms gegenüber dem cyanogenen Glucosid Amygdalin. Dennoch wurden 50 µL der einzelnen Fraktionen mit 50 µL einer 15 mM p-NPG-Lösung (0,1 M Imidazol/HCl-Puffer; pH 6,0) bei 35 °C im Trockenschrank in abgedeckten Mikrotiterplatten inkubiert, um in der großen Probenanzahl die Aktivität schnell und effektiv bestimmen zu können. Nach einer Inkubationsdauer von 10 Stunden wurde die enzymatische Reaktion durch die Zugabe von 100 µL einer eisgekühlten 0,07 M Natriumcarbonat-Lösung abgestoppt. Die aktiven Fraktionen wurden auf den Mikrotiterplatten detektiert, die entsprechenden Lösungen vereinigt und mit Microcon 30[®]-Konzentratoren auf 200 µL eingengt. Ein Aliquot von 100 µL wurde daraufhin einem Aktivitätstest mit Amygdalin als Substrat unterzogen (Inkubationsansatz, siehe Kapitel 2.7.1). Die Fraktionen, die die Aktivität einer simultanen Diglucosidase enthielt, wurden eingengt und mit einer SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese auf ihre Reinheit und Homogenität hin untersucht.

2.4.5 Gelfiltration mit Superdex 200[®]

Die gereinigte und eingengte Enzymlösung (Kapitel 2.4.4) der simultanen Diglucosidase aus *Davallia bullata* wurde zur Bestimmung des Molekulargewichtes der nativen Form auf einer Superdex 200[®]-Gelfiltrationssäule unter den nachfolgenden Bedingungen chromatographiert:

Säulenkörper: Länge 60 cm, Durchmesser 1,6 cm

Säulenvolumen: 120 mL

Säulenmaterial: Superdex 200[®] (Fa. Pharmacia)

Chromatographiepuffer: Imidazol/HCl-Puffer (0,1 M; pH6,0;
0,1 M Natriumchlorid)

Fluß: 0,6 mL/min

Fraktionsvolumen: 4 mL

Die Entwicklung der Säule erfolgte mit Hilfe einer Pumpe von oben nach unten. Die Proteine wurden kontinuierlich in einer Durchflußküvette durch die Messung der Extinktion bei 280 nm detektiert. Die Enzymaktivität der simultanen Diglucosidase wurde durch die Inkubation der einzelnen Fraktionen mit dem Substrat Amygdalin (Standardinkubationsansatz, siehe Kapitel 2.7.1) bestimmt.

2.5 Weitere verwendete Gelelektrophorese-Systeme

2.5.1 Präparative native anionische Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Fraktionen der Kationenaustauschersäule (Kapitel 2.3.3), die eine sequentielle Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* enthielten, wurden zur Beurteilung der Reinheit dieser Probe außerdem mit einer präparativen nativen Gelelektrophorese für saure Proteine untersucht. Durch diese, vom oben beschriebenen Verfahren der präparativen nativen kationischen Elektrophorese (Kapitel 2.3.4), abweichenden pH-Bedingungen lassen sich eventuelle Verunreinigungen der Proteinprobe nachweisen, die beim ausschließlichen Einsatz von nur einer elektrophoretischen Trennmethode nicht entdeckt worden wären. Zur Durchführung der präparativen nativen anionischen Gelelektrophorese wurde eine Mini Prep Cell[®]-Apparatur (Fa. BIORAD) und eine Vorschrift gemäß Ornstein und Davis (1964) verwendet. Das Trenn- bzw. das Sammelgel hatten einen Durchmesser von 7 mm und eine Höhe von 5 cm bzw. 1 cm. Die Trennzeit betrug 43 Stunden bei einer angelegten Spannung von 300 V und einer Stromstärke von 4 mA.

Im folgenden sind die Lösungen aufgelistet, die für die Herstellung des Trenn- bzw. Sammelgels verwendet worden:

	Trenngel	Sammelgel
30 % Acrylamid/Bis (30:0,8)	0,333 mL	0,167 mL
Tris/HCl (1,5 M); pH 8,8	0,625 mL	–
Tris/HCl (0,5 M); pH 6,8	–	0,313 mL
H ₂ O	1,54 mL	0,77 mL

AMPS (10 %ig)	6,25 µL	6,25 µL
TEMED	0,63 µL	1,25 µL

Die Acrylamidkonzentration betrug im Trenn- und Sammelgel 4 %. Die vereinigten, aktiven Kationenaustauscherfraktionen (Kapitel 2.3.3) wurden auf einen Tris/HCl-Puffer (0,5 M; pH 6,8) umgepuffert, eingeengt und mit dem Probenpuffer (0,0625 M Tris/HCl; pH 6,8; 25 % Glycerin; 0,012 % Bromphenolblau) versetzt. Die folgende Lösung wurde als Elektrodenpuffer eingesetzt: 0,025 M Tris; 0,192 M Glycin; pH 8,3.

Die von der präparativen nativen anionischen Gelelektrophorese eluierten und gesammelten Fraktionen hatten ein Volumen von je 500 µL. Die Bestimmung der Enzymaktivität der sequentiellen Diglucosidase erfolgte durch die Inkubation von 400 µL dieser Fraktionen mit 200 µL einer 12 mM p-Nitrophenyl- β -D-glucosid-Lösung (McIlvaine-Puffer; pH 5,6) bei 30 °C im Wasserbad. Nach einer Inkubationsdauer von 8 Stunden wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 1 mL einer eisgekühlten 0,07 M Natriumcarbonat-Lösung abgestoppt. Die aktiven Fraktionen wurden mit einer SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese auf ihre Reinheit und Homogenität hin untersucht.

2.5.2 Analytische native kationische Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um die Ergebnisse, die mit der präparativen nativen kationischen Gelelektrophorese (Kapitel 2.3.4) erzielt worden, zu bestätigen, wurde eine Trennung der nativen Proteine im analytischen Maßstab durchgeführt. Bei diesem Verfahren ist es möglich, die Aktivität der Enzyme im nativen Gel zu detektieren (Kapitel 2.5.8) und die Proteine aus dem Gel zu eluieren (Kapitel 2.5.3). Danach wurden die Proteine auf ein denaturierendes SDS-PAGE-Gel aufgetragen und mit einer Silberfärbung detektiert (Kapitel 2.5.4 und 2.5.5).

Zur Durchführung der Elektrophorese wurde eine Mini-Protean II[®]-Apparatur (Fa. BIORAD) und eine Vorschrift nach Rothe (1994) verwendet. Das Trenn- bzw. Sammelgel hatte eine Höhe von 5 cm bzw. 1 cm. Bei einer angelegten Spannung von 60 V und einer Stromstärke von 54 mA betrug die Trennzeit der Proteine 70 min.

Die Herstellung des Trenngels erfolgte unter Verwendung der nachfolgenden Lösungen:

	Trenngel
30 % Acrylamid/Bis (30:0,8)	2 mL
Kaliumhydroxid (480 mM); Essigsäure (3 M); TEMED (267 mM); pH 4,3	1 mL
H ₂ O	1 mL
AMPS (12,2 mM)	4 mL

Folgende Lösungen wurden für die Herstellung des Sammelgels verwendet:

	Sammelgel
10 % Acrylamid/Bis (10:2,5)	1 mL
Kaliumhydroxid (480 mM); Essigsäure (500 mM); TEMED (31 mM); pH 6,8	0,5 mL
H ₂ O	2 mL
Riboflavin (0,01 mM)	0,5 mL

Die Acrylamidkonzentration im Trenn- bzw. Sammelgel betrug 7,7 bzw. 3,1 %.

Zur Herstellung des Sammelgels wurden aktive Kationenaustauscherfraktionen (Kapitel 2.3.3) eingengt und auf den Sammelgelpuffer umgepuffert. Die Probe wurde dann zusammen mit dem Sammelgel 60 min lang unter UV-Licht polymerisiert. Als Elektrodenpuffer wurde eine Lösung aus 350 mM β -Alanin; 140 mM Essigsäure; pH 4,5 verwendet. Nach der durchgeführten Elektrophorese wurde das Gel in zwei identische Hälften zerteilt. Die eine Hälfte wurde einer Aktivitätsanfärbung mit 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucosid (Kapitel 2.5.8) zur Detektion der sequentiellen Diglucosidase unterzogen. In der anderen Hälfte des Gels wurden die aufgetrennten Proteine mit Coomassie Brilliant Blue R-250[®] angefärbt (Kapitel 2.5.7).

2.5.3 Extraktion der sequentiellen Diglucosidase aus einem nativen Gel

Die Bereiche der analytischen und nativen Gele für basische Proteine (Kapitel 2.5.2), bei denen sich mit 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucosid die Aktivität einer sequentiellen Diglucosidase anfärben ließ, wurden aus dem Gel ausgeschnitten.

Die Extraktion der Proteine aus den Gelstücken erfolgte nach einer Vorschrift der Firma Amicon (Amicon-Publikationen Nr. 311). Dazu wurden 200 µL des folgenden Extraktionspuffers verwendet: 100 mM NaHCO₃; 8 M Harnstoff; 3 % SDS; 0,5 % Triton X-100 (reduziert); 25 mM DDT). Die Extraktion erfolgte über Nacht bei 4 °C. Die erhaltene Lösung wurde mit Microcon 30[®]-Konzentratoren eingeeengt und auf den Sammelgelpuffer der SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese umgepuffert.

2.5.4 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese wurde nach einer Vorschrift von Laemmli (1970) in einer Mini-Protean II[®]-Apparatur (Fa. BIORAD) durchgeführt. Das Trenn- bzw. Sammelgel hatten eine Höhe von 5 cm bzw. von 1 cm. Die Trennzeit bei einer angelegten Spannung von 150 V und einer Stromstärke von 50 mA betrug 120 min. Folgende Lösungen wurden für die Herstellung des Trenn- bzw. Sammelgels verwendet:

	Trenngel	Sammelgel
40 % Acrylamid/Bis (40:1,2)	4,17 mL	0,625 mL
Tris/HCl (1 M); pH 8,8	6,27 mL	–
Tris/HCl (1 M); pH 6,8	–	0,625 mL
H ₂ O	5,93 mL	3,65 mL
AMPS (10 %ig)	0,133 mL	0,050 mL
SDS (10 %ig)	0,166 mL	0,050 mL
TEMED	13 µL	2,5 µL

Bei der Untersuchung der sequentiellen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* betrug die Acrylamidkonzentration im Trenngel 12,5 %. Der Ansatz wurde bei Verwendung eines 10 %igen Trenngels entsprechend modifiziert. Bei den elektrophoretischen Untersuchungen der simultanen Diglucosidase aus *Davallia bullata* betrug die Acrylamidkonzentration im Trenngel 8,7 %.

Die aufzutrennenden Proteinproben wurden in Tris/HCl-Puffer (0,5 M; pH 6,8) umgepuffert. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben 1:4 (v/v) mit

dem reduzierenden Probenpuffer (bestehend aus: 1 % SDS; 0,01 % NaN_3 ; 0,01 % Bromphenolblau; 26 mM DDT in 12,5 mM Tris/HCl-Puffer; pH 6,8) verdünnt (Westermeier, 1990). Der Elektrophoresepuffer bestand aus 25 mM Tris; 0,19 M Glycin und 0,1 % SDS.

2.5.5 Silberfärbung der Polyacrylamidgele

Die Silberfärbung der Polyacrylamidgele erfolgte nach einer Vorschrift von Heukeshoven und Dernick (1985).

1. Fixierung der Gele: 30 %ig Ethanol, 10 %ige Essigsäure über Nacht
2. Waschen: zweimal 10 min in 10 %igem Ethanol, dreimal 10 min in A. dest.
3. Silbernitratlösung: 0,1 %ig, 30 min
4. Spülen mit Wasser: 10 – 20 sec
5. Entwickeln: 2,5 – 3 %ige Na_2CO_3 -Lösung mit 0,02 % Formaldehyd, 5 – 10 min
6. Stoppen: 3 %ige Essigsäure, 5 min
7. Waschen mit Wasser: dreimal 10 min
8. Reduzieren der überschüssigen Silberpartikel mit dem Präparat "Farmer's Reducer" (Fa. Tetenal) zur verbesserten Haltbarkeit des Gels: 0,5 %ig, 10 – 30 sec
9. Spülen: 1 min unter fließendem Wasser
10. Waschen in Wasser: dreimal 10 min

Um eine vollständige Färbung des Gels zu erreichen, wurden die Vorgänge ab Schritt 3 einschließlich wiederholt.

2.5.6 Färbung der Polyacrylamidgele mit Periodsäure-Silberfärbung

Die Färbung zur Detektion von Glycoproteinen wurde gemäß Dubray und Bezard (1982) durchgeführt.

1. Fixierung der Gele: 25 %ig Isopropanol, 10 %ige Essigsäure über Nacht
2. Waschen: 30 min in 7,5 %iger Essigsäure
3. Periodsäure: 0,2 %ig für 1 Stunde bei 4 °C

4. Waschen in Wasser: unter häufigem Wechsel für 3 Stunden
5. Ammoniakalische Silbernitratlösung: 1,4 mL einer NH_3 -Lösung (konz.) wird zu 21 mL einer 0,36 %igen NaOH-Lösung gegeben, zu dieser Lösung werden 4 mL einer 19,4 %igen AgNO_3 -Lösung unter Rühren hinzugefügt, diese Lösung wird auf 100 mL aufgefüllt und zur Färbung des Gels (20 min lang) verwendet.
6. Spülen mit Wasser: 10 – 20 sec
7. Entwickeln: in einer Lösung, die 0,05 % Citronensäure; 0,019 % Formaldehyd und 10 % Methanol enthält
8. Stoppen der Reaktion: Zugabe einer 10 %igen Lösung eines käuflich erworbenen Photofixierers (Fa. Tetenal)

2.5.7 Färbung der Polyacrylamidgele mit Coomassie Brilliant Blue

Stammlösung: 2,5 g Coomassie Brilliant Blue R-250[®]

908 mL Ethanol

92 mL Essigsäure

Für die Färbung der Gele wurde eine Gebrauchslösung hergestellt, die aus einem Volumenanteil der Stammlösung und neun Volumenanteilen 7,5 %iger Essigsäure bestand. Die Gele wurden eine Stunde in der Gebrauchslösung geschüttelt. Als Entfärberlösung wurde 7,5 %ige Essigsäure über Nacht eingesetzt.

2.5.8 Aktivitätsanfärbung der nativen Gele mit 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucosid

Für eine Aktivitätsanfärbung der nativen Proteine im Gel wurden 50 μg des fluorigen Substrates 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucosid in 10 mL eines McIlvaine-Puffers (pH 5,6) gelöst. Das Gel wurde in dieser Lösung mehrere Stunden lang inkubiert. Die auftretende Fluoreszenz wurde nach Anregung bei 366 nm unter einer UV-Lampe detektiert.

2.6 Verwendung weiterer chromatographischer Trennmedien für die Reinigung der sequentiellen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis*

In diesem Kapitel sind die Versuche zur Reinigung der sequentiellen Diglucosidase aufgeführt, die keine Erhöhung des Reinigungsfaktors erbracht haben und deshalb bei der Präparation des Enzyms nicht weiter verwendet wurden. Da jedoch das Bindungsverhalten der sequentiellen Diglucosidase an diese verschiedenen Chromatographiemedien sehr interessante Daten zur Charakterisierung dieses Enzyms liefert, sind die Versuche mit in diese Arbeit integriert worden. Als Proteinproben wurden für die Gelfiltration mit Sephacryl S-300® (Kapitel 2.6.1) eine Proteinlösung verwendet, die zuvor nur einem Reinigungsschritt gemäß Kapitel 2.3.1 (Dialyse) unterzogen worden sind. Für die anderen chromatographischen Trennungen wurden Proteinproben eingesetzt, die bereits durch drei Reinigungsschritte (Kapitel 2.3 bis einschließlich der Kationenaustauschromatographie) gereinigt wurden waren.

2.6.1 Gelfiltration mit Sephacryl S-300®

Die durch eine Ammoniumsulfatfällung konzentrierte und anschließend dialysierte Hochsalzproteinlösung (Kapitel 2.3.1) wurde auf einer Sephacel S-300®-Gelfiltrationssäule chromatographisch unter den angegebenen Bedingungen aufgetrennt:

Säulenkörper: Länge 80 cm, Durchmesser 2,5 cm

Säulenvolumen: 400 mL

Säulenmaterial: Sephacel S-300® (Fa. Sigma)

Chromatographiepuffer: McIlvaine-Puffer (15 mM; pH 5,6;
100 mM NaCl)

Fluß: 0,6 mL/min

Fraktionsvolumen: 4 mL

Während der Chromatographie wurde die Detektion der Proteine kontinuierlich in einer Durchflußküvette durch die Messung der Extinktion bei 280 nm verfolgt.

Die Bestimmung der Enzymaktivität der sequentiellen Diglucosidase erfolgte durch die Inkubation der einzelnen Fraktionen mit den Substraten Amygdalin (Standardinkubationsansatz, siehe Kapitel 2.7.2) bzw. p-Nitrophenyl- β -D-glucosid (Standardinkubationsansatz, siehe Kapitel 2.7.2.4).

2.6.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie mit Phenylsepharose 6 Fast Flow[®]

Die auf einen McIlvaine-Puffer (50 mM; pH 6,0 mit 1,2 M Natriumchlorid) umpufferten Proben gemäß Kapitel 2.3.3 wurden auf eine mit Startpuffer konditionierte Phenylsepharose 6 Fast Flow[®] (low sub, Fa. Pharmacia)-Säule appliziert.

Säulenkörper: Hi Trap[™] HIC Test Kit[®] (Fa. Pharmacia)

Säulenvolumen: 1 mL

Säulenmaterial: Phenylsepharose 6 Fast Flow[®]
(low sub, Fa. Pharmacia)

Startchromatographiepuffer: McIlvaine-Puffer (50 mM; pH 6,0
mit 1,2 M Natriumchlorid)

Elutionspuffer: McIlvaine-Puffer (50 mM; pH 6,0)

Gradient: in 300 min, 100 % Elutionspuffer

Fluß: 0,3 mL/min

Fraktionsvolumen: 2 mL

Die Bestimmung der Enzymaktivität der sequentiellen Diglucosidase erfolgte durch die Inkubation der einzelnen Fraktionen mit den Substraten Amygdalin (Standardinkubationsansatz, siehe Kapitel 2.7.2) bzw. p-Nitrophenyl- β -D-glucosid (Standardinkubationsansatz, siehe Kapitel 2.7.2.4).

2.6.3 Hydroxyapatit

Die auf einen Phosphat-Puffer (10 mM Natriumphosphat; pH 7,2) umpufferten Proben gemäß Kapitel 2.3.3 wurden auf eine mit Startpuffer konditionierte Econo-Pac CHT-II[®] (Fa. BIORAD)-Säule appliziert.

Säulenkörper: Länge 4 cm, Durchmesser 0,5 cm

Säulenvolumen: 1 mL

Säulenmaterial: Macro-Prep Ceramic Hydroxyapatit[®] (Fa. BIORAD)

Startchromatographiepuffer: Phosphat-Puffer (10 mM; pH 7,2)

Elutionspuffer: Phosphat-Puffer (500 mM; pH 6,8)

Gradient: in 180 min, 100 % Elutionspuffer

Fluß: 0,3 mL/min

Fraktionsvolumen: 2 mL

Die Bestimmung der Enzymaktivität der sequentiellen Diglucosidase erfolgte durch die Inkubation der einzelnen Fraktionen mit dem Substrat p-Nitrophenyl- β -D-glucosid (Standardinkubationsansatz, siehe Kapitel 2.7.2.4).

2.6.4 Affinitätschromatographie mit Con A-Sepharose 4B[®]

Die auf einen Natriumacetat-Puffer (100 mM; pH 6,0; 500 mM Natriumchlorid; 1 mM Calciumchlorid; 1 mM Manganchlorid) umgepufferten Proben gemäß Kapitel 2.3.3 wurden auf eine mit Startpuffer konditionierte Con A-Agarose-Säule appliziert.

Säulenkörper: Länge 14 cm, Durchmesser 1,6 cm

Säulenvolumen: 15 mL

Säulenmaterial: Concanavalin A-Sepharose 4B[®]

Startchromatographiepuffer: Natriumacetat-Puffer (100 mM; pH 6,0; 500 mM Natriumchlorid; 1 mM Calciumchlorid; 1 mM Manganchlorid)

Elutionspuffer: Natriumacetat-Puffer (100 mM; pH 6,0; 500 mM Natriumchlorid; 1 mM Calciumchlorid; 1 mM Manganchlorid) mit 100 mM Methyl- α -mannosid

Gradient: in 770 min, 100 % Elutionspuffer

Fluß: 0,3 mL/min

Fraktionsvolumen: 2 mL

Die Bestimmung der Enzymaktivität der sequentiellen Diglucosidase erfolgte durch die Inkubation der einzelnen Fraktionen mit dem Substrat p-Nitrophenyl- β -D-glucosid (Standardinkubationsansatz, siehe Kapitel 2.7.2.4).

2.6.5 Anionenaustauscherchromatographie mit Q Sepharose High Performance[®]

Die auf einen McIlvaine-Puffer (15 mM; pH 7,0) umgepufferten Proben gemäß Kapitel 2.3.3 wurden auf eine mit Startpuffer konditionierte Hi Trap Q Sepharose[®] (Fa. Pharmacia)-Säule appliziert.

Säulenkörper: Hi Trap[™] ion exchange columns Q[®] (Fa. Pharmacia)

Säulenvolumen: 5 mL

Säulenmaterial: Q Sepharose[®] High Performance

Startchromatographiepuffer: McIlvaine-Puffer (15 mM; pH 7,0)

Elutionspuffer: McIlvaine-Puffer (15 mM; pH 7,0)
mit 1,5 M Natriumchlorid

Gradient: in 200 min 4 % Elutionspuffer; in 500 min 7 % Elutionspuffer;
in 750 min 50 % Elutionspuffer

Fluß: 0,3 mL/min

Fraktionsvolumen: 2 mL

Die Bestimmung der Enzymaktivität der sequentiellen Diglucosidase erfolgte durch die Inkubation der einzelnen Fraktionen mit dem Substrat p-Nitrophenyl- β -D-glucosid (Standardinkubationsansatz, siehe Kapitel 2.7.2.4).

2.6.6 Anionenaustauscherchromatographie mit DEAE-Sephacel[®]

Die auf einen McIlvaine-Puffer (15 mM; pH 7,0) umgepufferten Proben gemäß Kapitel 2.3.3 wurden auf eine mit Startpuffer konditionierte DEAE-Sephacel[®] (Fa. Sigma)-Säule appliziert.

Säulenkörper: Länge 9,2 cm, Durchmesser 2 cm

Säulenvolumen: 29 mL

Säulenmaterial: DEAE-Sephacel[®] (Fa. Sigma)

Startchromatographiepuffer: McIlvaine-Puffer (15 mM; pH 7,0)

Elutionspuffer: McIlvaine-Puffer (15 mM; pH 7,0)
mit 1,5 M Natriumchlorid

Gradient: in 300 min, 100 % Elutionspuffer

Fluß: 0,3 mL/min

Fraktionsvolumen: 2 mL

Die Bestimmung der Enzymaktivität der sequentiellen Diglucosidase erfolgte durch die Inkubation der einzelnen Fraktionen mit dem Substrat p-Nitrophenyl- β -D-glucosid (Standardinkubationsansatz, siehe Kapitel 2.7.2.4).

2.7 Bestimmung der Enzymaktivitäten

2.7.1 Simultane Diglucosidase

Die simultane Diglucosidase spaltet in einem simultanen Reaktionsmechanismus cyanogene Diglucoside (z. B. das cyanogene Diglucosid Linustatin) in ein Disaccharid (Gentiobiose) und das entsprechende α -Hydroxynitril (Acetoncyanhydrin) (Kuroki et al., 1984). Wird der Enzymsatz nach beendeter Inkubation alkalisch abgestoppt, zerfallen die gebildeten α -Hydroxynitrile in Carbonylverbindungen und Blausäure. Die Aktivitätsbestimmung der simultanen Diglucosidase erfolgte über die Messung der Konzentrationsänderung an Cyanid pro Zeiteinheit. Dazu wurden die folgenden Enzymsätze eine Stunde lang bei 30 °C im Wasserbad inkubiert.

Bestimmung der Aktivität der simultanen Diglucosidase aus Hevea brasiliensis:

0,2 mL Enzymlösung

0,2 mL cyanogenes Diglucosid (z. B. Amygdalin oder Linustatin;
12 mM; McIlvaine-Puffer; pH 5,6)

Bestimmung der Aktivität der simultanen Diglucosidase aus Davallia bullata:

0,05 mL Enzymlösung

1 mL cyanogenes Diglucosid (Amygdalin; 12 mM; McIlvaine-Puffer;
pH 6,0)

Zum Abstoppen der enzymatischen Reaktion und der vollständigen Hydrolyse der gebildeten α -Hydroxynitrile wurde die Lösung bei der Bestimmung der Aktivität der simultanen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* mit 0,2 mL bzw. bei der Bestimmung der Aktivität der simultanen Diglucosidase aus *Davallia bullata* mit 0,5 mL 1 N Natronlauge aus der Seitenbirne eines Thunberggefäßes versetzt. Die Verwendung von Thunberggefäßen gewährleistet, daß Natronlauge zugesetzt werden kann, ohne daß das Gefäß geöffnet werden muß und flüchtige Blausäure entweichen kann.

Die Aktivitätsbestimmung der simultanen Diglucosidase kann sowohl über die gebildete Menge an Cyanid als auch über die Gentiobiosemenge erfaßt werden. Für die Bestimmung der Cyanidkonzentration wurde ein photometrischer Fertigtest herangezogen (siehe Kapitel 2.7.2.3). Für die qualitative Bestimmung von Gentiobiose wurde im Rahmen dieser Arbeit eine HPLC-Methode mit vorheriger Derivatisierung entwickelt (siehe Kapitel 2.8.1).

2.7.2 Sequentielle Diglucosidase

Die sequentielle Diglucosidase spaltet in einem sequentiellen Reaktionsmechanismus bei cyanogenen Diglucosiden selektiv die terminale Glucose ab (Kuroki et al., 1984). Bei der Hydrolyse des natürlichen cyanogenen Substrates Linustatin durch die sequentielle Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* entstehen dabei das Monoglucosid Linamarin und Glucose. Die Aktivitätsbestimmung der sequentiellen Diglucosidase erfolgte über die Messung der gebildeten Konzentration an Glucose pro Zeiteinheit. Dazu wurde der folgende enzymatische Reaktionsansatz eine Stunde lang bei 30 °C im Wasserbad inkubiert:

0,2 mL Enzymlösung

0,2 mL cyanogenes Diglucosid (z. B. Amygdalin oder Linustatin;
12 mM; McIlvaine-Puffer; pH 5,6)

Zum Abstoppen der enzymatischen Reaktion und zur vollständigen Hydrolyse der gebildeten α -Hydroxynitrile wurde die Lösung mit 0,2 mL 1 N Natronlauge aus der Seitenbirne des Thunberggefäßes versetzt. Dieser angegebene Inkubationsansatz wurde gegebenenfalls bei einigen Ansätzen im Volumen verkleinert.

Für die Bestimmung der K_M - und v_{max} -Werte wurde der Ansatz wie folgt modifiziert:

0,05 mL Enzymlösung

0,2 mL cyanogenes Diglucosid (variable Konzentrationen der
Diglucoside; McIlvaine-Puffer; pH 5,6)

Die Inkubation erfolgte 60 Minuten lang bei 30 °C im Wasserbad in Thunberggefäßen. Die Reaktion wurde mit 0,1 mL 1 N NaOH abgestoppt.

Die Aktivitätsbestimmung der sequentiellen Diglucosidase kann sowohl über die gebildete Menge an Glucose als auch über die Linamarinmenge erfaßt werden. Für die Bestimmung der Glucosekonzentration wurde ein photometrischer Fertigtest verwendet (siehe Kapitel 2.7.2.2). Für den gleichzeitigen Nachweis der enzymatischen Reaktionsprodukte Glucose und Linamarin wurde eine HPLC-Methode mit vorheriger Derivatisierung entwickelt (siehe Kapitel 2.8.1).

In den Hochsalzproteinextrakten (Kapitel 2.2.1.2) aus *Hevea brasiliensis* läßt sich neben der Aktivität einer sequentiellen Diglucosidase auch noch eine Restaktivität an β -Glucosidase (Linamarase) nachweisen (Kapitel 3.1.8). Diese Restaktivität reicht aus, um die von der sequentiellen Diglucosidase gebildeten Produkte (cyanogene Monoglucoside) weiter zu den entsprechenden α -Hydroxynitrilen bzw. Glucose zu spalten. Diese α -Hydroxynitrile zerfallen spontan oder durch das Alkalisieren beim Abstoppen der enzymatischen Reaktion zu Blausäure und der entsprechenden Carbonylverbindung (Selmar et al., 1987; Cooke et al., 1978). Die entstandene Blausäure kann wie Glucose über einen photometrischen Fertigtest quantifiziert werden (siehe Kapitel 2.7.2.3). Um die Aktivität der sequentiellen Diglucosidase zu bestimmen, muß also berücksichtigt werden, daß ein Teil der bestimmten Glucosemenge aus der enzymatischen Spaltung des entstehenden Linamarins durch die Aktivität der Linamarase freigesetzt wurde. Aus einem Molekül eines cyanogenen Diglucosids entstehen

demnach bei der Hydrolyse durch die sequentielle Diglucosidase und die β -Glucosidase (Linamarase) zwei Moleküle Glucose und ein Molekül Blausäure. Die Aktivität einer sequentiellen Diglucosidase kann somit aus der Formel

$$[\text{Glucose}_{\text{sequentielle Diglucosidase}}] = [\text{Glucose}_{\text{total}}] - [\text{HCN}]$$

berechnet werden.

2.7.2.1 Bestimmung der Enzymaktivität der sequentiellen Diglucosidase mit Amygdalin als Substrat

Das natürliche Substrat der sequentiellen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* ist das cyanogene Diglucosid Linustatin, welches sich käuflich nicht erwerben läßt. Um den Verlauf der Proteinreinigung verfolgen zu können, wurde in der Regel das cyanogene Diglucosid Amygdalin als Substrat eingesetzt.

Die sequentielle Diglucosidase aus *Hevea* hat eine nahezu gleich hohe Affinität zum cyanogenen, aromatischen Diglucosid Amygdalin wie zum cyanogenen aliphatischen Diglucosid Linustatin. Im Gegensatz zum Monoglucosid Linamarin, wird das aus der Hydrolyse des Amygdalins hervorgehende Monoglucosid Prunasin *in vitro* auch von der sequentiellen Diglucosidase gespalten, die in diesem Fall quasi als Monoglucosidase agiert. Dadurch entsteht bei der Inkubation von Amygdalin mit der sequentiellen Diglucosidase auch in Abwesenheit einer Linamarase-Restaktivität Glucose und Mandelonitril, welches unter den alkalischen Bedingungen im abgestoppten Enzymansatz zu Benzaldehyd und Blausäure äquimolar im Verhältnis 1:1 zerfällt. Damit muß auch bei hochgereinigten Fraktionen die Bestimmung der Aktivität der sequentiellen Diglucosidase mit dem Substrat Amygdalin über die in Kapitel 2.7.2 angegebenen Formel erfolgen. Die Inkubationsbedingungen wurden entsprechend der Aktivitätsabnahme des Enzyms während der Reinigung angepaßt.

2.7.2.2 Glucosebestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der enzymatisch abgespaltenen Glucose erfolgte mit dem Fertigtest 14365[®] der Firma Merck über die GOD-PAP-Methode.

Glucose-Oxidase (GOD) katalysiert in Gegenwart von Sauerstoff und Wasser die Oxidation der Glucose zu Wasserstoffperoxid und Gluconsäure. Das bei dieser Reaktion gebildete Wasserstoffperoxid reagiert in Gegenwart von Peroxidase mit Aminoantipyrin und p-Hydroxybenzoesäure zu dem Farbstoff *N*-(4-antipyril)-p-benzochinonimin. Die Extinktion des gebildeten Farbstoffes wurde photometrisch bei 510 nm bestimmt und ist der Menge an gebildeter Glucose proportional. Die Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten ($6.310 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ bei 510 nm) erfolgte über eine Kalibriergerade.

Zur Bestimmung der enzymatisch gebildeten Glucose wurden 300 μL der Inkubationslösung des jeweiligen Enzymansatzes entnommen und durch Zusatz von 1 M Salzsäure neutralisiert und anschließend mit 3 mL der Glucosereaktionstestlösung versetzt.

2.7.2.3 Cyanidbestimmung

Die Bestimmung der Konzentration des gebildeten Cyanids erfolgte mit dem Fertigtest Spectroquant® 14800 der Firma Merck, der eine Modifikation der Methode von Aldridge (1944) darstellt. Die Nachweisgrenze dieses Tests liegt in einem Bereich von 0,005 – 0,5 mg/L Cyanid. Die Farbreaktion beruht auf der Reaktion von Cyanid mit Chlor zu Chlorcyan. Dieses reagiert mit Pyridin unter Bildung von Glutacondialdehyd, der mit 1,3-Dimethylbarbitursäure zu einem violetten Polymethinfarbstoff kondensiert. Die Extinktion des gebildeten Farbstoffs wurde photometrisch bei 585 nm bestimmt und ist der Menge des gebildeten Cyanids proportional. Der molare Extinktionskoeffizient ($131.600 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ bei 585 nm) wurde über eine Kalibriergerade ermittelt.

Der photometrische Test wurde mit einem Aliquot der Inkubationslösung des jeweiligen Enzymansatzes durchgeführt. Die alkalische Lösung wurde durch Zusatz von 1 M Salzsäure neutralisiert und mit 500 μL McIlvaine-Puffer pH 7,0 (15 mM) abgepuffert. Das Reaktionsvolumen wurde mit Wasser auf 5 mL aufgefüllt und die Testreagentien entsprechend der Herstellerangabe zugegeben.

2.7.2.4 Bestimmung der Enzymaktivität der sequentiellen Diglucosidase mit p-Nitrophenyl- β -D-glucosid als Substrat

Die sequentielle Diglucosidase aus *Hevea* spaltet neben den cyanogenen Diglucosiden auch andere Substrate, z. B. das künstliche Substrat p-Nitrophenyl- β -D-glucosid. Zur Aktivitätsbestimmung wurde der von Hösel und Nahrstedt (1975) beschriebene Standardtest wie folgt modifiziert:

0,1 mL Enzymlösung

0,1 mL p-Nitrophenyl- β -D-glucosid (12 mM in McIlvaine-Puffer; pH 5,6)

bei 30 °C 30 min lang inkubieren. Das Abstoppen der Inkubation erfolgte durch Zugabe von 2,5 mL einer eisgekühlten 0,07 molaren Na_2CO_3 -Lösung. Die Extinktion des gebildeten Farbstoffs p-Nitrophenol wurde photometrisch bei 400 nm bestimmt. Der molaren Extinktionskoeffizienten ($18.600 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ bei 400 nm) wurde über eine Kalibriergerade ermittelt.

Für die Bestimmung der K_M - und der v_{\max} -Werte wurde der Inkubationsansatz wie folgt modifiziert:

0,05 mL Enzymlösung

0,2 mL p-Nitrophenyl- β -D-glucosid (variable Konzentrationen in McIlvaine-Puffer; pH 5,6)

bei 30 °C 15 min lang inkubieren. Das Abstoppen der Inkubation erfolgte durch Zugabe von 2 mL einer eisgekühlten 0,07 molaren Na_2CO_3 -Lösung.

2.7.2.5 Bestimmung der Linamarase-Aktivität

Die Proteinfractionen, die von der Gelfiltrationssäule gemäß Kapitel 2.3.2 eluiert wurden, wiesen noch einen geringen Anteil an β -Glucosidase (Linamarase) auf. Die Aktivität dieser β -Glucosidase wurde durch Inkubation der Proteinelösung mit dem cyanogenen Monoglucosid Linamarin und anschließender Bestimmung der Konzentration an gebildeter Glucose und Cyanid pro Zeiteinheit quantifiziert. Dazu wurde der folgende Enzymansatz in einem Thunberggefäß eine Stunde lang bei 30 °C inkubiert:

0,2 mL Enzymlösung

0,2 mL Linamarinlösung (12 mM; McIlvaine-Puffer; pH 5,6)

Zum Abstoppen der enzymatischen Reaktion und zur vollständigen Hydrolyse der partiell gebildeten α -Hydroxynitrile wurde die Lösung mit 0,2 mL 1 N Natronlauge aus der Seitenbirne des Reaktionsgefäßes versetzt.

Die Aktivitätsbestimmung der Linamarase erfolgte über die Konzentrationsänderung an Glucose und Cyanid über die Zeit. Für die Bestimmung der Glucose- bzw. der Cyanidkonzentration wurden photometrische Fertigtests herangezogen (siehe Kapitel 2.7.2.2 und 2.7.2.3).

2.7.3 Kinetische Daten der sequentiellen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis*

2.7.3.1 Aktivitätsbestimmung bei unterschiedlichen pH-Werten

Zur Ermittlung des pH-Optimums der sequentiellen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* wurden die gemäß Kapitel 2.3.3 gereinigten Kationenaustauscherfraktionen eingesetzt. Die Inkubation wurde mit dem Standardinkubationsansatz (Kapitel 2.7.1) mit Amygdalin als Substrat durchgeführt. Der pH-Wert des McIlvaine-Puffers wurde in einem pH-Bereich von 3,5 bis 8,5 variiert. Die Substratkonzentration im Reaktionsansatz betrug 5 mM.

2.7.3.2 Aktivitätsbestimmung bei unterschiedlichen Inkubationszeiten

Um zu überprüfen, ob sich während des Inkubationsansatzes die Reaktionsgeschwindigkeit aufgrund von Substratverknappung oder durch Instabilität der sequentiellen Diglucosidase ändert, wurde die Reaktionsgeschwindigkeit nach verschiedenen Inkubationszeiten (0 bis 75 min) bestimmt (gemäß Kapitel 2.7.1).

2.7.3.3 Aktivitätsbestimmung bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen

Zur Ermittlung der optimalen Inkubationstemperatur der sequentiellen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* wurden die gemäß Kapitel 2.3.3 gereinigten Kationenaustauscherfraktionen bei unterschiedlichen Temperaturen eingesetzt. Die Inkubation wurde mit dem Standardinkubationsansatz (Kapitel 2.7.1) mit Amygdalin als Substrat durchgeführt. Die Inkubationstemperatur wurde in

einem Bereich von 20 bis 70 °C variiert. Die Substratkonzentration im Reaktionsansatz betrug 5 mM.

2.8 Analyse der Spaltprodukte des Linustatinabbaus mit der HPLC

Das natürliche Substrat der sequentiellen und der simultanen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* ist das cyanogene Diglucosid Linustatin. Da diese Substanz keine aromatischen Gruppe im Molekül aufweist, kann weder die Edukt- noch die Produktkonzentration über die Bestimmung der UV-Absorption ermittelt werden. Somit müßte die Detektion von Linustatin und seinen Spaltprodukten bei einer HPLC-Auftrennung durch einen Brechungsindexdetektor erfolgen. Da sich dieser Nachweis für die Aktivitätsbestimmung der Diglucosidasen aus *Hevea* als zu unempfindlich erwies, mußte eine alternative Nachweismethode entwickelt werden. Als geeignet erwies sich die Derivatisierung der cyanogenen Glucoside und ihrer Abbauprodukte über die Einfügung einer aromatischen Benzoat-Gruppe in das Molekül, wodurch der Nachweis der Substanzen mittels UV-Detektor ermöglicht wird.

2.8.1 Derivatisierung der Produkte des enzymatischen Linustatinabbaus mit Pyridin/Benzoylchlorid

Die entwickelte HPLC-Methode ist eine Modifikation, der in der Lebensmittelanalytik eingesetzten Methode von Galensa und Schäfers (1981).

Bei den verwendeten Standardsubstanzen (Linustatin, Linamarin, Gentiobiose, Glucose) wurden jeweils 5 mg Substanz mit 0,4 mL Pyridin und 50 µL Benzoylchlorid in einem verschließbaren Reagenzglas versetzt. Die Reaktionsgemische wurden eine Stunde bei 60 °C im Ultraschallbad behandelt. Durch Zugabe von 50 µL Methanol wurden die Reaktionen abgestoppt. Dabei wurde überschüssiges Benzoylchlorid zu Methylbenzoat umgesetzt. Die anschließende Fällung der Benzoate erfolgte jeweils durch Zusatz von 4 mL Wasser, da Benzoate in Wasser unlöslich sind. Die entstandenen Suspensionen wurden eine Stunde bei Raumtemperatur belassen, bevor sie portionsweise auf Festphasenkartuschen (Sepak RP-18[®], Fa. Waters) aufgegeben wurden. Zunächst wurde die jeweilige

Kartusche mit Wasser (4 x 1 mL) pyridinfrei gewaschen. Anschließend wurde zum Austreiben des Wassers Luft durch die einzelnen Kartusche gedrückt (etwa 50 mL). Die Benzoate wurden mit einem Lösungsmittelgemisch (Isooctan/Diethylether/Acetonitril, 15/8/2) eluiert (4 x 1 mL; 1 x 0,5 mL). Die Eluate wurden jeweils auf genau 5 mL aufgefüllt und konnte als Standardsubstanzen für die HPLC verwendet werden.

Für die Benzoylierung der Produkte der enzymatischen Spaltung von Linustatin erfolgten die Inkubationen von 0,4 mL Enzymlösung mit 0,1 mL einer Linustatinlösung (5 mM; McIlvaine-Puffer; pH 5,6) bei 30 °C für eine Stunde im Wasserbad. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von flüssigem Stickstoff abgestoppt. Nach einer Gefriertrocknung wurde der jeweilig entstandene Rückstand mit 1 mL Methanol versetzt. Für den Nachweis der Reaktionsprodukte der sequentiellen Diglucosidase wurden 100 µL bzw. für die simultane Diglucosidase 500 µL der entsprechenden methanolischen Lösung entnommen. Die Aliquots wurden im Luftstrom zur Trockne eingengt. Die Derivatisierung erfolgte unter den für die Standardsubstanzen genannten Bedingungen.

HPLC-Trennbedingungen:

Säulenkörper: 25 x 0,4 cm, mit Vorsäule

Säulenmaterial: RP 18, Partikelgröße 5 µm

Laufmittel: Acetonitril/Wasser/tert. Butylmethylether (60/40/10)

Fluß: 0,9 mL/min

Detektor: UV/VIS 230 nm

2.9 Proteinbestimmung

2.9.1 Methode nach Bradford

Die Bestimmung der löslichen Proteine erfolgte mit dem BIORAD Protein Assay[®] nach der Methode von Bradford (1976). Dieser Nachweis beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250[®] an Proteine. Der entstehende

Komplex hat sein Extinktionsmaximum bei 595 nm, während das des freien Farbstoffs in saurer Lösung bei 465 nm liegt.

Die nach den Herstellerangaben hergestellte Gebrauchslösung wurde mit 100 µL der zu bestimmenden Proteinlösung versetzt. Die Ermittlung des Proteingehaltes der Probe konnte mit Hilfe einer mit Rinderserumalbumin hergestellten Kalibrierkurve (Standardansatz: 0,1 – 1,0 mg/mL) durchgeführt werden.

2.9.2 Methode mit dem Fluoreszenzfarbstoff NanoOrange[®]

Für die geringen Proteinkonzentrationen der aufgereinigten Fraktionen der sequentiellen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* und der simultanen Diglucosidase aus *Davallia bullata* wurde die empfindliche Proteinbestimmungsmethode des NanoOrange[™] Protein Quantitation Kits[®] (Fa. Molecular Probes) eingesetzt.

Die Proteinbestimmung mit diesem Test erfolgte durch Zugabe der Proteinlösung (bis zu 50 µL) zu dem verdünnten NanoOrange[®]-Reagenz (auffüllen auf 2,5 mL). Die Lösung wurde auf 95 °C für 10 min erhitzt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Inkubation muß im Dunkeln stattfinden. Die Fluoreszenz des gebildeten Komplexes wird im Fluoreszenzphotometer bestimmt (Emission bei 590 nm, Excitation bei 485 nm). Das Prinzip dieser Tests beruht auf der Fluoreszenzantwort des proteingebundenen Farbstoffs (NanoOrange), der frei in wäßriger Lösung nicht fluoresziert. Der entstehende Komplex zeigt ein breites Excitationsmaximum bei 470 – 490 nm und ein Emissionsmaximum bei 570 – 590 nm. Als Kalibrierkurve wurden Konzentrationen im Bereich von 0,01 – 10 µg/mL einer Rinderserumalbuminlösung verwendet. Beim Blindwert wurde anstelle der Proteinlösung die entsprechende Pufferlösung eingesetzt.

2.10 Aktivatoren und Hemmstoffe der sequentiellen und der simultanen Diglucosidase

2.10.1 Einfluß von Metallionen auf die Aktivitäten der sequentiellen und der simultanen Diglucosidase

Um den Einfluß von Metallionen auf die Aktivität der sequentiellen bzw. der simultanen Diglucosidase zu testen, wurden verschiedene Metallionen (CaCl₂,

MgCl₂, CoCl₂ und MnCl₂, jeweils 5 mM im Inkubationsansatz für die sequentielle Diglucosidase; CaCl₂, ZnCl₂, FeCl₃, AgNO₃, CuSO₄ und MnCl₂, jeweils 1 mM für die simultane Diglucosidase) dem folgenden Enzymansatz zugesetzt:

0,4 mL Amygdalinlösung (12 mM; McIlvaine-Puffer; pH 5,6)

0,05 mL Enzymlösung (gemäß Kapitel 2.3.3 bzw. Kapitel 2.4.3).

Die Inkubation wurde in Thunberggefäßen im Wasserbad durchgeführt. Die Inkubationsdauer betrug 60 min bei 30 °C. Das Abstoppen der enzymatischen Reaktion erfolgte durch das Vermischen mit 0,2 mL 1 N Natronlauge aus der Seitenbirne des Gefäßes. Die Enzymaktivität der Diglucosidasen wurde durch die Bestimmung der freigesetzten Cyanid- und Glucosemenge gemäß Kapitel 2.7.1 und 2.7.2 bestimmt.

2.10.2 Einfluß von β -Glucosidase-Hemmstoffen auf die Aktivitäten der sequentiellen und der simultanen Diglucosidase

Die Beeinflussung der Aktivität der sequentiellen Diglucosidase durch β -Glucosidase-Hemmstoffe wurde durch den Zusatz von Castanospermin, *N*-D-Glucosylpiperidin, Nojirimycin, δ -Gluconolacton oder *N*-D-Galactosylpiperidin (jeweils 1 mM im Inkubationsansatz) zum Enzyminkubationsansatz untersucht. Diese Substanzen sind Strukturanaloga der Substrate von β -Glucosidasen und führen zu einer kompetitiven Hemmung des Enzyms. Für die simultane Diglucosidase wurden Glucosyl- und Galactosylpiperidin als Hemmstoffe (jeweils 2 mM im Inkubationsansatz) verwendet.

Enzymansatz: 0,4 mL Amygdalinlösung (12 mM; McIlvaine-PufferpH 5,6)

0,05 mL Enzymlösung (gemäß Kapitel 2.3.3 bzw. Kapitel 2.4.3)

Die Inkubation wurde in Thunberggefäßen im Wasserbad durchgeführt. Die Inkubationsdauer betrug 60 min bei 30 °C. Die enzymatischen Reaktion wurde durch das Vermischen des Ansatzes mit 0,2 mL 1 N Natronlauge aus der Seitenbirne des Gefäßes abgestoppt. Die Enzymaktivität der Diglucosidasen wurde durch die Bestimmung der freigesetzten Cyanid- und Glucosemenge gemäß Kapitel 2.7.1 und 2.7.2 bestimmt.

2.10.3 Beeinflussung der Aktivitäten der sequentiellen und der simultanen Diglucosidase durch andere Effektoren

Es wurde der Einfluß von Substanzen untersucht, die bei der Reinigung der sequentiellen bzw. der simultanen Diglucosidase stabilisierend wirken oder andere Bedeutung haben (z. B. als Puffersubstanzen). Folgende Stoffe wurden dem folgenden Enzymansatz zugesetzt: EDTA, Triton X, Ascorbinsäure (jeweils 5 mM im Inkubationsansatz), SDS, NH_4HCO_3 , NaN_3 , Triethanolamin, Imidazol, Histidin, (jeweils 20 mM im Inkubationsansatz) und LiCl (0,2 M im Inkubationsansatz). Für die simultane Diglucosidase wurde der Enzymansatz unter Zusatz von EDTA und DDT (jeweils 5 mM) untersucht.

Die Enzyminkubation wurde unter Standardinkubationsbedingungen (siehe Kapitel 2.7.1 und 2.7.2) durchgeführt. Die Enzymaktivität wurde gemäß Kapitel 2.7 mit Amygdalin als Substrat bestimmt. Die Enzymaktivität der sequentiellen Diglucosidase wurde durch die Bestimmung der freigesetzten Cyanid- und Glucosemenge gemäß Kapitel 2.7.2 bestimmt.

2.11 Präzipitationsversuche mit einem β -Glucosidase-Antiserum

In einem Hochsalzproteinextrakt (Kapitel 2.2.1.2) aus *Hevea*-Blättern lassen sich noch Reste einer β -Glucosidase (Linamarase) bestimmen (Kapitel 2.7.2). Bei der Hydrolyse des cyanogenen Diglucosids Linustatin durch die sequentielle Diglucosidase wird Linamarin gebildet, welches weiter durch die Linamarasereste zu Glucose und Acetoncyanhydrin umgesetzt wird. Letzteres zerfällt zu Aceton und Blausäure. Die im Inkubationsansatz entstandene Blausäure kann folglich nur von der Aktivität einer Linamarase herrühren, die das Monoglucosid Linamarin weiter hydrolysiert. Um zu überprüfen, ob es sich bei dieser Monoglucosidase tatsächlich um Reste der *Hevea* β -Glucosidase handelt, wurden Proteinextrakten einer Hochsalzpräparation (Kapitel 2.2.1.2) aus *Hevea*-Blättern immunologisch untersucht. Dazu wurden 100 μL des Hochsalzproteinextraktes mit unterschiedlichen Mengen (1 – 100 μL) eines Antiserums, welches gegen die β -Glucosidase von *Hevea brasiliensis* aus Kaninchen gewonnen wurde (Selmar, 1986), versetzt. Der Inkubationsansatz wurde mit PBS-Puffer pH 7,0 (150 mM NaCl in 10 mM

Na₂HPO₄/NaH₂PO₄-Puffer) auf ein Endvolumen von 1 mL aufgefüllt. Entsprechende Kontroll- und Blindwerte wurden angesetzt. Unter leichter Schüttelbewegung wurde 1,5 Stunden bei Raumtemperatur und 20 Stunden bei 4 °C inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Proben 60 min bei 30.000 x g zentrifugiert. 700 µL des Überstandes wurden mit 3 µL einer 0,5 %igen Citronensäurelösung auf einen pH-Wert von 5,5 eingestellt. Diese Lösung wurde zum Standardinkubationstest (Kapitel 2.7.2) mit Linustatin als Substrat eingesetzt, um die Aktivität der sequentiellen Diglucosidase zu bestimmen. Die Quantifizierung der freigesetzten Glucose- bzw. Cyanidmenge wurde analog Kapitel 2.7.2 durchgeführt.

2.12 Adsorptionsverhalten der sequentiellen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis*

2.12.1 Adsorption der sequentiellen Diglucosidase an Membranmaterialien

Die sequentielle Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* adsorbiert an unterschiedlichen Membranmaterialien (Kapitel 3.2, Punkt 3). Dieser Sachverhalt wurde wie folgt untersucht: ein Aliquot einer Enzymlösung (gemäß Kapitel 2.2.1.2) wurde mit Wasser verdünnt und die entstandene Lösung gleichmäßig auf Reagenzgläser verteilt. Die Enzymlösungen wurden mit kleinen Stücken folgender unterschiedlicher Membranmaterialien versetzt:

1. Dialysemembran (Fa. Serva),
2. Ultrafiltrationsmembran (Fa. Millipore, Membran auf Polysulfonbasis) und
3. Membran der verwendeten Konzentratoren (Fa. Amicon).

Der gleiche Versuchsansatz wurde unter Zusatz von jeweils 1 M NaCl in den verschiedenen Enzymlösungen wiederholt. Anschließend wurden die jeweiligen Lösungen für 3 Stunden im Kühlschrank belassen. Jedes Membranstück wurde mit 100 µL Wasser abgespült, dieses Waschwasser mit der Enzyminkubationslösung vereinigt und gemäß Kapitel 2.7.2 mit Amygdalin als Substrat inkubiert, um die Aktivität der sequentiellen Diglucosidase zu bestimmen. Die Enzym-

aktivität in den unterschiedlichen Lösungen wurde nach den durchgeführten Glucose- und Cyanidbestimmungen gemäß Kapitel 2.7.2 berechnet.

2.12.2 Adsorption der sequentiellen Diglucosidase an Zellwandtrümmer

Die von Natriumchlorid befreiten Zellwandtrümmer einer Aufarbeitung aus *Hevea*-Blättern (Kapitel 2.2.1.2) wurde in eine leere Plastikfertigsäule (Höhe 1,3 cm, Ø 1,2 cm) gegeben. Auf diese gefüllte Fertigsäule wurde ein von niedermolekularen Bestandteilen gereinigter Hochsalzproteinextrakt (Kapitel 2.2.1.2) aufgetragen. Die Fertigsäule wurde mehrmals mit 1 mL McIlvaine-Puffer (pH 5,6) gewaschen und die Eluate aufgefangen. Um den Anteil an sequentieller Diglucosidase zu eluieren, der unter diesen Niedersalzbedingungen an die Zellwandtrümmer adsorbiert worden ist, wurde die Säule mit McIlvaine-Puffer, der 1,2 M Natriumchlorid enthielt, beladen. Die Niedersalz- und Hochsalzeluate wurden mit Konzentratoren (Centriprep 30[®], Trenngrenze: 30.000 Dalton, Fa. Amicon) auf ein Volumen von ~ 1,5 mL eingengt. Zur Bestimmung der Aktivität der sequentiellen Diglucosidase in den verschiedenen, eingengten Eluaten wurde ein Standardinkubationsansatz (Kapitel 2.7.2) mit Amygdalin als Substrat durchgeführt. Die Berechnung der freigesetzten Cyanid- und Glucosemengen erfolgte gemäß Kapitel 2.7.2.

3 Ergebnisse

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Reinigung und der Charakterisierung der sequentiellen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* und der simultanen Diglucosidasen aus *Hevea brasiliensis* bzw. *Davallia bullata*. Dabei zeigte sich, daß die simultane Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* nicht mit konventionellen chromatographischen Proteinreinigungsmethoden bearbeitet werden konnte. Kuroki et al. (1984) beschreiben eine Vicianin-Hydrolase in *Davallia trichomanoides*, die das cyanogene Diglucosid Vicianin gemäß eines simultanen Mechanismus hydrolysiert. Entsprechende Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zeigten, daß sich in *Davallia bullata* ebenfalls eine simultane Diglucosidase nachweisen ließ. Somit wurde aus den Wedeln dieses Farns das entsprechende Enzym gereinigt.

Die sequentielle Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* und die simultane Diglucosidase aus *Davallia bullata* sind bis zur Homogenität gereinigt und biochemisch charakterisiert worden. Des weiteren wurden die simultane und die sequentielle Diglucosidase in unterschiedlichen Keimungsstadien von *Hevea*-Samen untersucht.

Bei den gebräuchlichen Bezeichnungen der unterschiedlichen Diglucosidasen kann es leicht zu Mißverständnissen kommen. Aus diesem Grund sei hier auf einige Besonderheiten hingewiesen. Die unterschiedlichen Diglucosidasen waren bislang in der Literatur nur im Hinblick auf die verletzungsbedingte Cyanogenese untersucht wurden. Dabei werden die entsprechenden Diglucosidasen (z. B. die Amygdalin-Hydrolase) als Enzyme beschrieben, die in der Lage sind, von cyanogenen Diglucosiden selektiv nur den terminalen Zucker des Moleküls abzuspalten (Kuroki et al., 1984). Als Endprodukte der Katalyse liegen jeweils ein Zuckermolekül und das entsprechende cyanogene Monoglucosid vor. Kuroki et al. (1984) verwendeten die Bezeichnung "sequentiell" dabei lediglich zur Charakterisierung des Mechanismus mit dem ein Diglucosid durch eine Diglucosidase gespalten werden kann und nicht als Bezeichnung für ein Enzym.

Die entstandenen Hydrolyseprodukte (Monoglucosid und Zucker) werden z. B. bei der verletzungsbedingten Cyanogenese in einem zweiten Schritt von einer β -Glucosidase in das entsprechende α -Hydroxynitril und ein weiteres Zuckermolekül gespalten. Dieser Reaktionsweg beschreibt eine Möglichkeit der enzymatischen Hydrolyse cyanogener Diglucoside. Als eine zweite Variante zeigen Kuroki et al. (1984) den simultanen Mechanismus auf. Dabei wird das Diglucosid in einem Reaktionsschritt in ein Disaccharid und das entsprechende α -Hydroxynitril gespalten. Kuroki et al. (1984) beschreiben für *Davallia trichomanoides* (L.) den simultanen Spaltungsmechanismus für cyanogene Diglucoside und für *Prunus serotina* die sequentielle Hydrolyse cyanogener Diglucoside.

Erst Selmar (1992) beschrieb das Vorhandensein beider Spaltungsmechanismen in ein und derselben Pflanze (*Hevea brasiliensis*) und formulierte einen Stoffwechselweg ("Linustatin-Weg"), in dem gezeigt wurde, daß die cyanogenen Diglucoside einer Pflanze und die zugehörigen katabolisierenden Enzyme nicht nur für die verletzungsbedingte Cyanogenese eine Rolle spielen, sondern auch für die Metabolisierung und Verlagerung von cyanogenen Glucosiden innerhalb der Pflanze.

3.1 Sequentielle und simultane Diglucosidasen in *Hevea brasiliensis*

Zu Beginn dieser Arbeit lagen nur wenige Daten zur sequentiellen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* vor. Selmar (1992) beschreibt, daß durch Behandeln des abfiltrierten Rückstandes einer Homogenisation von *Hevea*-Blättern mit Natriumchlorid-Lösung die Aktivität einer sequentiellen Diglucosidase nachweisbar ist.

3.1.1 Pflanzenmaterial

Die Verlagerungs- und Metabolisierungsvorgänge der cyanogenen Glucoside in *Hevea brasiliensis* finden wahrscheinlich besonders in sich entwickelnden Geweben (z. B. beim Blattaustrieb oder bei der Sämlingsentwicklung) statt. Somit wurden im Rahmen dieser Arbeit die Aktivitäten der sequentiellen und der

simultanen Diglucosidase sowohl in sich entwickelnden Blättern also auch in Samen und Sämlingen bestimmt.

3.1.2 Nachweis einer sequentiellen Diglucosidase in Blättern von *Hevea brasiliensis*

Der Nachweis der Aktivität einer sequentiellen Diglucosidase in *Hevea brasiliensis* ist mit experimentellen Schwierigkeiten verbunden. In Enzymextrakten aus *Hevea*-Blättern, die unter Niedersalzbedingungen (Kapitel 2.2.1.1) hergestellt werden, läßt sich keine Aktivität einer sequentiellen Diglucosidase nachweisen (Bestimmung nach Kapitel 2.7.2). Die entsprechenden Enzymextrakte müssen zur Abtrennung der niedermolekularen Stoffe, die den Nachweis der sequentiellen Diglucosidase stören, über eine Gelfiltrationssäule (PD-10 Columns®, Sephadex G-25®) gegeben werden.

Das Versetzen der abzentrifugierten Sedimentationsrückstände einer Homogenisation (Kapitel 2.2.1.1) mit einem Detergenz (0,5 % ige Triton X-100-Lösung), zum Auflösen von Biomembranen und zur Freisetzung der daran gebundenen Proteine, erbrachte keinen Nachweis der Aktivität einer sequentiellen Diglucosidase in Blättern von *Hevea brasiliensis*.

Als zuverlässige Präparationsmethode für einen Enzymextrakt, der zur Bestimmung der Aktivität der sequentiellen Diglucosidase eingesetzt werden konnte, erwies sich das einstündige Inkubieren des abfiltrierten Homogenisationsrückstandes mit einer 1,2 M Natriumchlorid-Lösung (im folgenden als Hochsalzextrakt bezeichnet; Kapitel 2.2.1.2). Nach Abtrennung der niedermolekularen Stoffe durch eine Gelfiltrationssäule (PD-10 Columns®, Sephadex G-25®) lassen sich in den Hochsalzextrakten Aktivitäten einer Linustatinspaltenden sequentiellen Diglucosidase im Bereich von 50 bis 500 pkat/g FG nachweisen.

3.1.3 Nachweis einer simultanen Diglucosidase in Blättern von *Hevea brasiliensis*

In Niedersalzenzymextrakten (Kapitel 2.2.1.1) aus Blättern von *Hevea brasiliensis* ließ sich die Aktivität einer simultanen Diglucosidase bestimmen

(Kapitel 3.7). Der Nachweis der Aktivität der simultanen Diglucosidase erfolgte über die enzymatische Hydrolyse eines cyanogenen Diglucosids in Gentiobiose und ein α -Hydroxynitril, welches nach der alkalischen Hydrolyse Blausäure freisetzt. Dabei konnte die Aktivität einer simultanen Diglucosidase aber nur in 30 % der durchgeführten Homogenisationen aus *Hevea*-Blättern nachgewiesen werden (Kapitel 3.7).

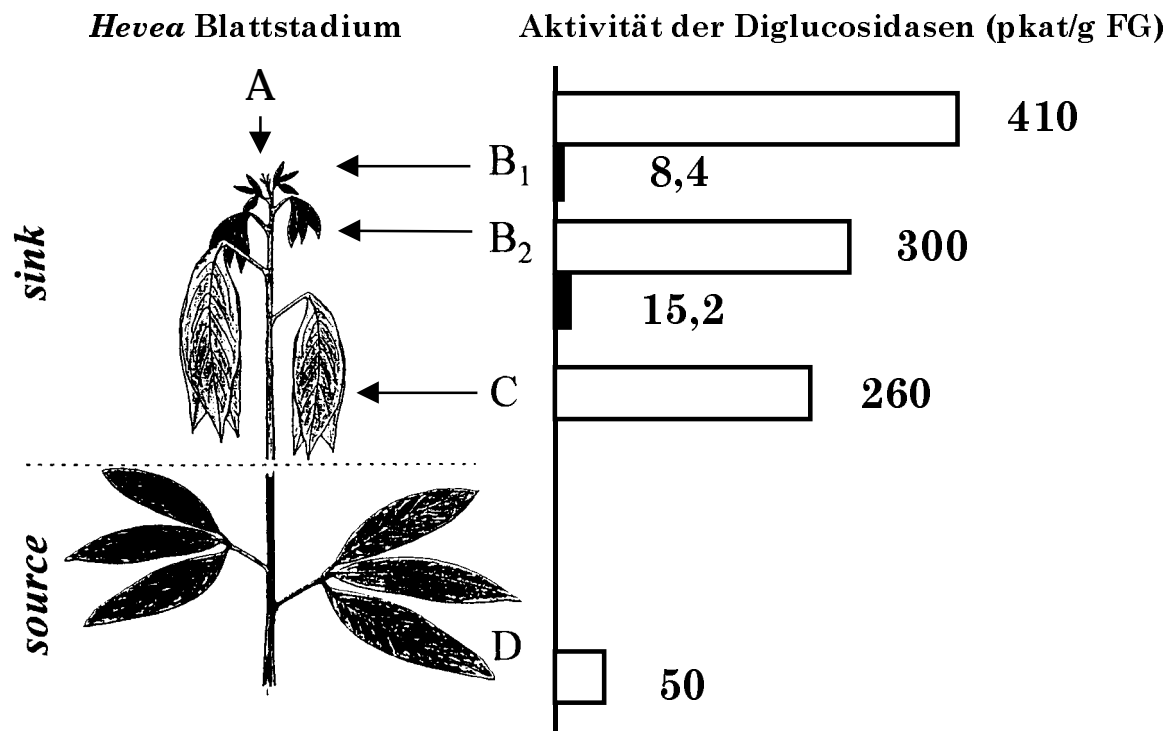
3.1.4 Änderung der Aktivität der sequentiellen und der simultanen Diglucosidase während der Blattentwicklung

Eine Metabolisierung und/oder Verlagerung cyanogener Glucoside in *Hevea brasiliensis* findet z. B. von adulten Blättern (*physiological source*) in sich entwickelnde Blätter (*physiological sink*) statt. Dabei kann das Diglucosid Linustatin nach dem Transport innerhalb der Pflanze entweder durch eine sequentielle Diglucosidase oder durch eine simultane Diglucosidase hydrolysiert werden. Die Bestimmung der unterschiedlichen Aktivitäten der sequentiellen und der simultanen Diglucosidase in verschiedenen Blattentwicklungsstadien ermöglicht es, eine physiologische Beurteilung vorzunehmen (siehe Kapitel 4.6.4, Diskussion).

Die Kenntnis über die Abhängigkeit der Enzymaktivität vom Entwicklungsstadium der Blätter ist außerdem dazu geeignet, um zur Reinigung der sequentiellen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* Pflanzenmaterial zu verwenden, welches eine hohe Aktivität aufweist und in ausreichender Menge zur Verfügung steht. Die Definition der Blattentwicklungsstadien ist Tabelle 1 (Seite 12) zu entnehmen. Die einzelnen Blattstadien sind in Abbildung 6 mit Pfeilen gekennzeichnet.

Es wurden Blätter von *Hevea brasiliensis* geerntet, die sich in unterschiedlichen physiologischen Entwicklungsstadien (Blattstadien B – D) befanden. In den entsprechenden Nieder- und Hochsalzproteinextrakten (Kapitel 2.7.1 und 2.7.2) wurden die Aktivitäten der sequentiellen und der simultanen Diglucosidase bestimmt. Die Enzymaktivitäten sind in Abbildung 6 dargestellt.

Abbildung 6: Abhängigkeit der Aktivitäten der sequentiellen und der simultanen Diglucosidase vom Entwicklungsstadium der Blätter von *Hevea brasiliensis*



Legende zu Abbildung 6:

Die Definition der Blattentwicklungsstadien von *Hevea brasiliensis* erfolgte gemäß Kapitel 2.1.1.1. Zur Aktivitätsbestimmung der sequentiellen und der simultanen Diglucosidase wurden Niedersalz- und Hochsalzextrakte (siehe Kapitel 2.2.1.1 und 2.2.1.2) aus jeweils 20 g der einzelnen Blattstadien hergestellt. Die Aktivität gegenüber dem Diglucosid Amygdalin wurde, nach Abtrennung der endogenen niedermolekularen Stoffe über eine PD-10 Säule, aus der freigesetzten Cyanid- und/oder Glucosemenge berechnet (siehe Kapitel 2.7). Die Aktivitätswerte der sequentiellen bzw. simultanen Diglucosidase sind den hell bzw. dunkel dargestellten Balken zu entnehmen.

Die Aktivität einer sequentiellen Diglucosidase ist in allen untersuchten Blattstadien nachweisbar. Die Enzymaktivitäten im Blattstadium A wurden aufgrund der geringen Blattgröße und Verfügbarkeit des Blattmaterials nicht bestimmt. Im Stadium B₁ ist die Aktivität der sequentiellen Diglucosidase am höchsten. Bezogen auf diesen Aktivitätswert lassen sich im Blattstadium B₂ noch etwa 75 %, im Stadium C 63 % und im Stadium D (adulte Blätter) ein Zehntel nachweisen. Bezogen auf das Frischgewicht nimmt die Aktivität der sequentiellen Diglucosidase (in pkat/FG) also mit dem Blattalter ab.

Eine Umrechnung und Darstellung der Enzymaktivitäten als Aktivität pro Blatt liefert ein differenzierteres Bild (Tabelle 2). Bei dieser Betrachtungsweise wird deutlich, daß die Aktivität der sequentiellen Diglucosidase in den Blattentwicklungsstadien B₂ und C am höchsten ist. Diese Entwicklungsstadien entsprechen der Wachstumsphase vor dem "Aufrichten" der Blätter. Besonders stark ist der Aktivitätszuwachs im Übergang vom Blattentwicklungsstadium B₁ zu B₂.

Tabelle 2: Abhängigkeit der Aktivitäten der sequentiellen und der simultanen Diglucosidase vom Entwicklungsstadium der Blätter von *Hevea brasiliensis*

Blattstadium	Aktivität (pkat/Blatt)	
	Sequentielle Diglucosidase	Simultane Diglucosidase
B ₁	78	1,6
B ₂	300	15,2
C	394	0
D	77	0

Legende zu Tabelle 2:

Die in Abbildung 6 dargestellten Werte wurden von der Bezugsgröße "Frischgewicht" (Abbildung 6) auf die Bezugsgröße "Blatt" umgerechnet.

Die simultane Diglucosidase aus *Hevea* ist während der Blattentwicklung nur im Stadium B aktiv. Auf das Frischgewicht bezogen ist die Aktivität im Blattstadium B₁ fast um die Hälfte niedriger als im Blattstadium B₂. In den Blattstadien C und D läßt sich keine Aktivität einer simultanen Diglucosidase nachweisen.

Zusammenfassend ist also festzustellen, daß die Aktivität beider Diglucosidasen sehr stark vom Entwicklungsstadium der *Hevea*-Blätter abhängt. Beide Enzyme sind vor allem in jungen, wachsenden Blättern aktiv, während in adulten Blättern keine bzw. nur deutlich geringere Aktivitäten nachweisbar sind. Die Abhängigkeit der Aktivität der sequentiellen Diglucosidase von der Blattentwicklung wurde bereits an einer anderen Pflanze untersucht: in *Manihot esculenta* konnte Warnecke (1995) einen sehr ähnlichen Verlauf des oben dargestellten Aktivitätsmusters der sequentiellen Diglucosidase in sich entwickelnden

Blättern nachweisen. Vor dem Hintergrund des "Linustatin-Wegs" (Abbildung 4; Selmar, 1992) bedeutet dies, daß die cyanogenen Diglucoside Linustatin bzw. Neolinustatin u. a. in Blattentwicklungsstadien hydrolysiert werden können, in denen die Blätter ein starkes physiologisches *sink* darstellen. Damit verfügen die jungen *sink*-Blätter über Enzymaktivitäten, die es ihnen ermöglichen, die aus den *source*-Blättern importierten Transportmetabolite wieder zu hydrolysieren.

Für die Vorgehensweise bei der Enzymreinigung der sequentiellen Diglucosidase sind die Aktivitätsunterschiede der sequentiellen Diglucosidase in den einzelnen Blattgeweben ebenfalls bedeutungsvoll. Als Ausgangsmaterial für die Reinigung wurden somit *Hevea*-Blätter des Blattentwicklungsstadium B – C verwendet.

3.1.5 Verteilung der Aktivität der sequentiellen Diglucosidase und der simultanen Diglucosidase in Homogenisationsextrakten

Die Gesamtaktivität der sequentielle Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* ließ sich fast vollständig im Hochsalzproteinextrakt einer Aufarbeitung aus den Zellwandtrümmern von Blättern nachweisen. In diesem Hochsalzextrakt befand sich trotz des intensiven Waschens des Extraktionsrückstandes mit hypotonischem Puffer immer noch eine Restaktivität der β -Glucosidase (Linamarase) von 3,5 % (bezogen auf die Gesamtaktivität im Pflanzenmaterial).

Die Aktivität der simultanen Diglucosidase befand sich hingegen – falls nachweisbar – ausschließlich im Niedersalzproteinextrakt. In Tabelle 3 ist die errechnete Verteilung der Aktivitäten der unterschiedlichen Diglucosidasen und der β -Glucosidase dargestellt, die sich in den Blättern von *Hevea brasiliensis* bestimmen ließen.

Tabelle 3: Verteilung der sequentiellen Diglucosidase, der simultanen Diglucosidase und der β -Glucosidase in Homogenisationsextrakten

	Niedersalzproteinextrakt	Hochsalzproteinextrakt
Proteingehalt ¹	99,4 %	0,6 %
Enzymaktivität:		
β -Glucosidase	96,5 % (223,4 nkat/g FG)	3,5 % (8,2 nkat/g FG)
Sequentielle Diglucosidase	4 % (0,01 nkat/g FG)	96 % (0,25 nkat/g FG)
Simultane Diglucosidase	100 % (6,6 pkat/g FG)	0 %

Legende zu Tabelle 3:

¹ Die Bestimmung der löslichen Proteine im Hochsalzproteinextrakt aus Blättern von *Hevea brasiliensis* erfolgte nach der Methode von Bradford (1976). Die prozentuale Verteilung des Proteingehaltes auf den Nieder- und den Hochsalzproteinextrakt erfolgt rechnerisch unter der Annahme, daß *Hevea*-Blätter des aufgearbeiteten Stadiums B₂ einen Proteingehalt von 50 mg/g Frischgewicht aufweisen. Der Hochsalzproteinextrakt wurde durch die Behandlung mit 1,2 M NaCl-Pufferlösung der abfiltrierten Zellwandtrümmer des Niedersalzextraktes hergestellt. Die Aktivitätsbestimmungen wurden in den unterschiedlichen Proteinextrakten nach Abtrennung der niedermolekularen Stoffe durch eine Gelfiltration über eine PD-10 Column® (Kapitel 2.2.1.1 und 2.2.1.2) möglich. Die Bestimmung der Enzymaktivitäten erfolgte über die angegebenen Standardinkubationsansätze (β -Glucosidase: siehe Kapitel 2.7.2.4 mit p-NPG und siehe Kapitel 2.7.2.5 mit Linamarin als Substrat; sequentielle Diglucosidase: siehe Kapitel 2.7.2 mit Linustatin als Substrat; simultane Diglucosidase: siehe Kapitel 2.7.1 mit Linustatin als Substrat). Die dargestellten Werte sind Einzelmessungen aus einer repräsentativen Aufarbeitung.

3.1.6 Besonderheiten bei der Bestimmung der Aktivität der sequentiellen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis*

Bei der Bestimmung der Aktivität der sequentiellen Diglucosidase aus *Hevea*-Proteinextrakten sind einige Besonderheiten zu beachten. Erstens läßt sich in den Hochsalzextrakten aus *Hevea*-Blättern trotz des fünfmaligen Waschens des Extraktionsrückstandes mit Pufferlösung immer noch die *Hevea* β -Glucosidase (Linamarase) nachweisen (siehe Kapitel 2.11, Präzipitationstests mit Antikörpern gegen die lösliche β -Glucosidase). Zwar sind stets nur noch Bruchteile der Gesamtaktivität der Linamarase in der Hochsalzproteinlösung vorhanden, doch aufgrund der sehr großen Aktivität dieses Enzyms im Blatt (~ 250 nkat/g FG) stellen selbst einige Promille der Linamarase-Gesamtaktivität mehrfach höhere Aktivitätswerte dar, als sie für die sequentielle Diglucosidase bestimmt wurden (0,05 – 0,41 nkat/g FG; siehe Kapitel 3.1.4). Diese Restaktivität der hoch expremierten Monoglucosidase in einem Diglucosidase-Enzymtest spaltet die

freigesetzten Monoglucoside (z. B. Linamarin, Prunasin) weiter, die aus der Hydrolyse der cyanogenen Diglucoside (z. B. Linustatin, Amygdalin) durch die sequentielle Diglucosidase hervorgegangen waren. Bei dieser Reaktion entstehen die entsprechenden α -Hydroxynitrile und ein weiteres Glucosemolekül. Die entstandenen α -Hydroxynitrile sind instabil und zerfallen beim alkalischen Abstoppen des Enzymsatzes quantitativ in die entsprechenden Carbonylverbindungen und Blausäure.

Um die Aktivität der sequentiellen Diglucosidase zu berechnen, ist eine Bilanzierung der Endprodukte nach stöchiometrischen Gesichtspunkten nötig. Folgende Formel wird für die Berechnung verwendet:

$$[\text{Glucose}_{\text{sequentielle Diglucosidase}}] = [\text{Glucose}_{\text{total}}] - [\text{HCN}]$$

Zusätzlich ist ein weiterer Punkt bei der Bestimmung der Aktivität der sequentiellen Diglucosidase zu beachten. Dieses Enzym spaltet auch solche cyanogenen Monoglucoside, die einen aromatischen Rest im Aglykon aufweisen. Dies bedeutet, daß z. B. das cyanogene Monoglucosid Prunasin, welches aus der Spaltung durch die sequentielle Diglucosidase hervorgegangen ist, weiter gespalten werden kann, einerseits durch die in noch nicht gereinigten Proteinextrakten in geringer Menge vorhandene β -Glucosidase (Monoglucosidase) oder andererseits in hochgereinigten Fraktionen durch die sequentielle Diglucosidase. Die gemäß Kapitel 2.7.2.2 durchgeführte Glucosebestimmung im neutralisierten Enzymreaktionsansatz (z. B. mit dem Hochsalzproteinextrakt) erfaßt folglich die Summe der abgespaltenen Glucosereste aus der Hydrolyse durch die sequentielle Diglucosidase und/oder die β -Glucosidase. Das aus der Spaltung des Monoglucosids stammende Glucosemolekül ist der gemäß Kapitel 2.7.2.3 bestimmten Cyanidkonzentration äquimolar, so daß die Aktivität der sequentiellen Diglucosidase ebenfalls aus der Differenz der gesamten Glucosekonzentration und der Cyanidkonzentration mit der oben angegebenen Formel berechnet werden kann.

Durch den alleinigen Einsatz der photometrischen Bestimmungsmethoden für die Reaktionsprodukte (Glucose und Cyanid) der enzymatischen Hydrolyse ergibt sich ein weiteres Problem bezüglich der Differenzierung der einzelnen an der

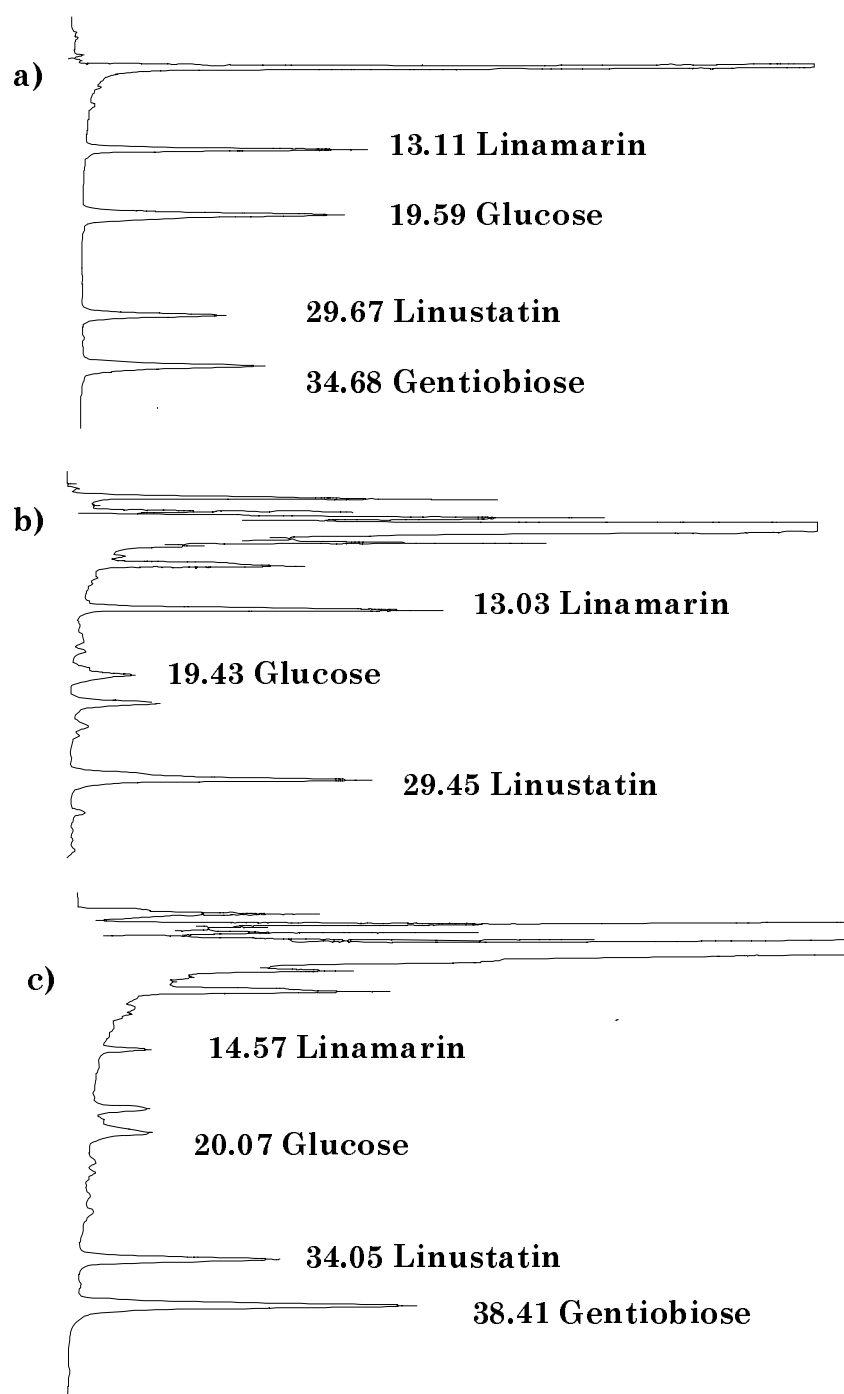
Hydrolyse beteiligten Enzyme. Es ist bei der Verwendung photometrischer Methoden nicht möglich, nach der enzymatischen Hydrolyse eines cyanogenen Diglucosids, zwischen den Aktivitäten einer sequentiellen Diglucosidase und einer β -Glucosidase (Linamarase) bzw. den Aktivitäten einer simultanen Diglucosidase und eines Enzyms, welches Gentiobiose spaltet, zu unterscheiden. Beide Kombinationen der Enzymaktivitäten liefern rechnerisch das gleiche Ergebnis, und die bestimmten Glucose- und Cyanidkonzentrationen lassen keine Aussage darüber zu, ob es sich um die Aktivität einer sequentiellen oder einer simultanen Diglucosidase handelt. Um diese Frage zu klären, ist es notwendig alle Hydrolyseprodukte (Cyanid, Glucose, Gentiobiose, Linamarin) eines Enzymansatzes nach der Inkubation eines Hochsalz- bzw. Niedersalzproteinextraktes mit dem cyanogenen Diglucosid Linustatin zu untersuchen. Dieser qualitative Nachweis der einzelnen Reaktionsprodukte läßt sich neben der gaschromatographischen Analyse (GC) auch mit einer in dieser Arbeit entwickelten Methode unter Einsatz der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) führen, die im folgenden Kapitel beschrieben wird.

3.1.7 Analyse der Spaltprodukte des cyanogenen Diglucosids Linustatin mit Hilfe der HPLC und UV-Detektion

Das natürliche Substrat der sequentiellen und der simultanen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* ist das cyanogene Diglucosid Linustatin. Diese Substanz weist wie einige andere cyanogene Glycoside keine aromatische Gruppe im Molekül auf. Somit kann z. B. eine Detektion von Linustatin und seinen Spaltprodukten bei einer HPLC-Auftrennung nur mit einem Brechungsindexdetektor erfolgen. Da sich dieses Vorgehen für die Aktivitätsnachweise der Diglucosidasen als zu unempfindlich erwies, wurde eine qualitative Nachweismethode entwickelt, die im Zuge einer Derivatisierung der cyanogenen Glucoside und ihrer Abbauprodukte eine aromatische Benzoat-Gruppe in das jeweilige Molekül einführt. Damit ist der empfindliche Nachweis der Endprodukte einer enzymatischen Umsetzung bei einem HPLC-Lauf mit einem UV-Detektor möglich. Die Nachweisgrenze der entwickelten Methode beträgt dabei für das cyanogene Monoglucosid Linamarin 2 nM.

Es erfolgte die Inkubation partiell gereinigter Niedersalz- bzw. Hochsalzproteinextrakte aus Blättern von *Hevea brasiliensis* mit dem natürlichen Substrat Linustatin. Der Enzymansatz und die anschließenden Benzoylierung der Reaktionsprodukte wurde gemäß Kapitel 2.8.1 durchgeführt. In Abbildung 7 sind die Ergebnisse dieser Inkubationen nach Analyse der Reaktionsprodukte über HPLC mit UV-Detektion dargestellt.

Abbildung 7: HPLC-Chromatogramme von Standardsubstanzen und der Reaktionsprodukte des enzymatischen Linustatin-Abbaus



Legende zu Abbildung 7:

Die Lösungen mit den Substanzen wurden nach Benzoylierung über eine RP-18-Säule aufgetrennt; Fließmittel: Acetonitril/Wasser/tert.-Butylmethylether, 60:40:10; Detektor: UV/VIS, 230 nm. In Chromatogramm a) ist die Auftrennung der Standardsubstanzen dargestellt; Chromatogramm b) zeigt die Abbauprodukte von Linustatin nach Inkubation mit einer sequentiellen Diglucosidase mit einer Proteinfraction der Kationenaustauscherchromatographie (Kapitel 2.3.3); Chromatogramm c) zeigt die Abbauprodukte des Linustatins nach einer Inkubation mit simultaner Diglucosidase mit einer Niedersalzproteinfraction, die einer Gelfiltration analog Kapitel 2.3.2 unterzogen wurde.

Die Substanzen, die mögliche Produkte der enzymatischen Abbaureaktionen darstellen, wurden unter Chromatogramm a) mit ihren Retentionszeiten als Standardsubstanzen aufgeführt.

Beim Abbau des cyanogenen Diglucosids Linustatin durch die sequentielle Diglucosidase eines partiell gereinigten Hochsalzproteinextraktes (vollständige Abtrennung der Linamarase) ließen sich Glucose und das Monoglucosid Linamarin nachweisen (Chromatogramm b) der Abbildung 7). Dieser Nachweis des cyanogenen Monoglucosids Linamarin zeigte, daß es sich bei der bisher über die freigesetzte Glucose- und Cyanidmenge photometrisch bestimmten Aktivität eindeutig um eine sequentielle Diglucosidase handelte.

Beim Abbau des cyanogenen Diglucosids Linustatin durch die simultane Diglucosidase, vorliegend in einem Niedersalzextrakt, ließ sich Gentiobiose nachweisen (Chromatogramm c) der Abbildung 7). Dieser Nachweis des Disaccharids zeigte, daß es sich bei der bisher photometrisch über die Cyanidfreisetzung bestimmten Aktivität eindeutig um eine simultane Diglucosidase handelte.

Im Chromatogramm c) ließ sich außerdem neben Gentiobiose auch noch Glucose und das cyanogene Monoglucosid Linamarin nachweisen. Dieses Vorhandensein von Glucose und Linamarin in einem Inkubationsansatz eines Niedersalzextraktes wies auf das Vorkommen geringer Aktivität der sequentiellen Diglucosidase im Niedersalzproteinextrakt einer Aufarbeitung aus Blättern von *Hevea brasiliensis* hin (Kapitel 3.1.5, Tabelle 3).

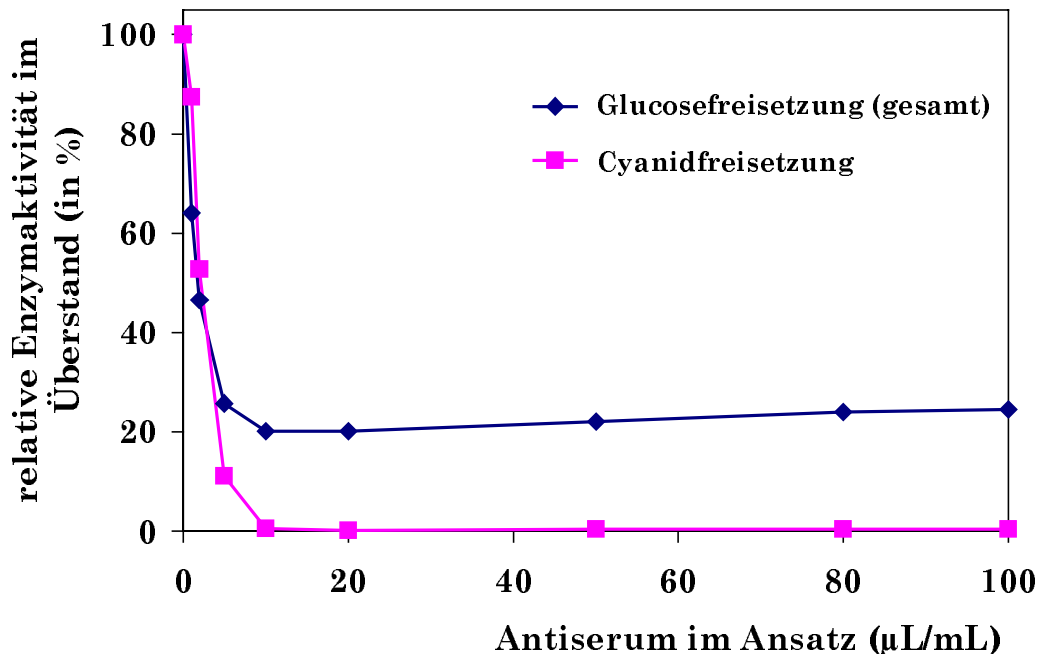
Mit der in dieser Arbeit entwickelten, für einen Mikroansatz adaptierten HPLC-Methode ist es erstmals gelungen, eindeutig die Reaktionsprodukte der enzymatischen Umsetzungen durch die Diglucosidasen in den unterschiedlichen Enzymextrakten zu differenzieren. Im Kautschukbaum *Hevea brasiliensis* können somit sowohl eine sequentielle als auch eine simultane Diglucosidase nebeneinander vorkommen, die sich in den unterschiedlich hergestellten Enzymextrakten (Nieder- bzw. Hochsalzbedingungen) nachweisen lassen.

3.1.8 Präzipitationsversuche mit dem β -Glucosidase Antiserum aus Kaninchen

Die Präzipitationsversuche (Kapitel 2.11) mit dem Antiserum gegen die β -Glucosidase aus *Hevea* sollten zeigen, daß sich in einem Hochsalzproteinextrakt aus *Hevea*-Blättern (Kapitel 2.2.1.2), trotz des mehrmaligen Waschens der Zellwandtrümmer mit hypotonischem Puffer, noch Reste der β -Glucosidase bestimmen lassen. Das Vorhandensein dieser Linamarase in einem Hochsalzproteinextrakt war durch die fortschreitende Hydrolyse des cyanogenen Diglucosids Linustatin zu Blausäure nachweisbar. Eine sequentielle Diglucosidase spaltet Linustatin nur in Glucose und das Monoglucosid Linamarin (Substratspektrum der gereinigten sequentiellen Diglucosidase, Kapitel 3.4). In diesem Zusammenhang ist es außerdem wichtig zu klären, ob die in der Hochsalzfraktion auftretende β -Glucosidase-Aktivität auf weitere, bislang für *Hevea* nicht bekannte β -Glucosidasen zurückzuführen ist, oder ob es sich hierbei um Reste der relativ unspezifischen Linamarin spaltenden β -Glucosidase aus *Hevea*-Blättern handelt.

Es wurde die Inkubation von Hochsalzproteinextrakten (gemäß Kapitel 2.2.1.2) mit unterschiedlichen Mengen eines Antiserums gegen die β -Glucosidase aus *Hevea brasiliensis* (Selmar, 1986) durchgeführt (Abbildung 8).

Abbildung 8: Präzipitationskurve für die β -Glucosidase aus *Hevea brasiliensis* in Hochsalzextrakten



Legende zu Abbildung 8:

100 μ L eines gemäß Kapitel 2.2.1.2 hergestellten Hochsalzextraktes wurden mit unterschiedlichen Volumina (1 – 100 μ L) des β -Glucosidase-Antiserums (aus Kaninchen; Selmar, 1986) versetzt (Kapitel 2.11). Nach der Inkubation der abzentrifugierten Überstände mit dem cyanogenen Diglucosid Linustatin wurden die Glucose- und Cyanidfreisetzung im Enzymansatz bestimmt (Kapitel 2.7.2.2 und 2.7.2.3). 100 % Glucosefreisetzung entsprechen 1,44 nkat/mL; 100 % Cyanidfreisetzung entsprechen 0,72 nkat/mL. Jeder Meßpunkt entspricht einer Glucose- bzw. Cyanidbestimmung.

Mit steigender Konzentration des Antiserums im Hochsalzproteinextrakt ließ sich keine Cyanidfreisetzung mehr nachweisen. Die Glucosefreisetzung hingegen blieb fast auf dem gleichen Niveau. Die im Hochsalzproteinextrakt erhaltenen β -Glucosidasereste (Linamarase) ließen sich folglich mit dem verwendeten Antiserum ausfällen. Die Aktivität der sequentiellen Diglucosidase führte nur zu einer Freisetzung von Glucose.

Da sich die gesamte β -Glucosidase-Aktivität (Linamarase) in den Hochsalzextrakten mit dem Antiserum aus *Hevea* ausfällen ließ, ist das Vorhandensein weiterer, bisher nicht bekannter β -Glucosidasen in *Hevea* auszuschließen.

3.1.9 Adsorption der sequentiellen Diglucosidase an die Extraktionsrückstände einer Aufarbeitung aus *Hevea*-Blättern

Um zu untersuchen, ob die sequentielle Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* nach einer Hochsalzextraktion aus Blättern erneut postmortal an die Zellwandbruchstücke adsorbiert, wurde ein von Natriumchlorid befreiter Hochsalzextrakt (Kapitel 2.2.1.2) über eine Plastiksäule gegeben, in der sich die mit verdünntem McIlvaine-Puffer (pH-Wert: 5,6) gewaschenen Zellwandbruchstücke einer Aufarbeitung befanden (Kapitel 2.12.2). Die aufgetragene Aktivität der sequentiellen Diglucosidase betrug 0,12 nkat/mL. In den sich anschließenden Glucose- und Cyanidbestimmungen konnten in dem ersten Säuleneluat, welches kein Natriumchlorid enthielt, etwa 5 % der auf die Zellwandtrümmer aufgetragenen Aktivität der sequentiellen Diglucosidase nachgewiesen werden. Der Rest (95 %) der aufgegebenen Aktivität ließ sich in den anschließend mit NaCl eluierten Fraktionen nachweisen.

Dieser Versuch hat bewiesen, daß die sequentielle Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* reversibel an den Zellwandtrümmern einer Aufarbeitung aus Blättern adsorbiert wird. Die Adsorption kann durch Zugabe ionischer Verbindungen (NaCl) wieder rückgängig gemacht werden. Diese Ergebnisse unterstreichen die Annahme, daß die sequentielle Diglucosidase aus *Hevea* postmortal aufgrund ionischer Wechselwirkungen an die Zellwandtrümmer einer Aufarbeitung adsorbiert wird.

3.1.10 Kinetische Daten der *in vitro* Aktivitätsbestimmung der sequentiellen Diglucosidase

Photometrische Fertigtests

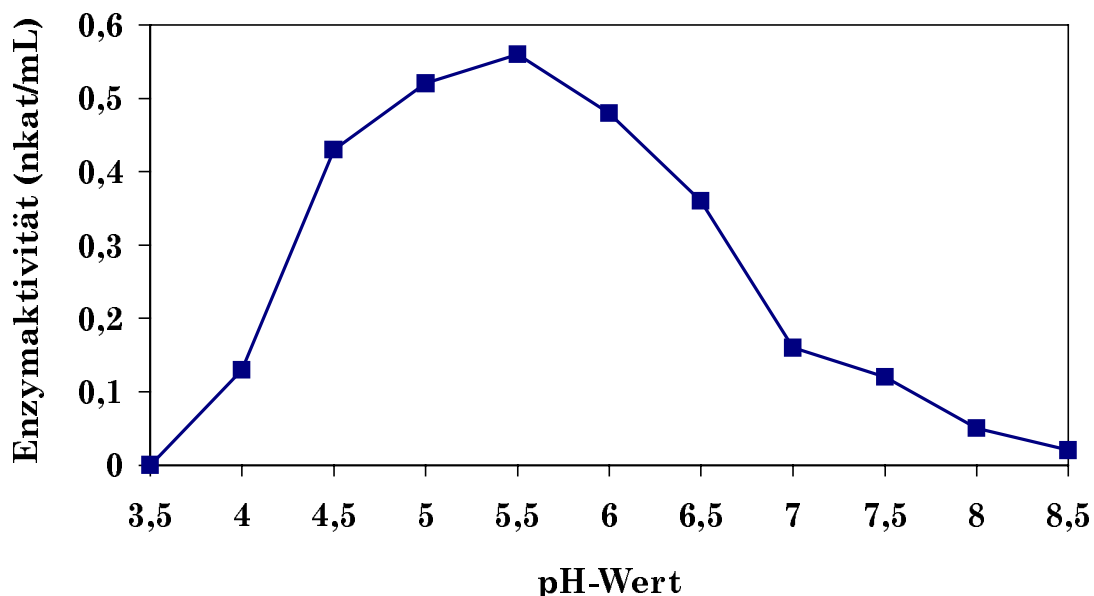
Eine erfolgreiche Nachweis- und Bestimmungsmethode für die Aktivität eines Enzyms ist eine wichtige Voraussetzung für dessen erfolgreiche Reinigung. Die Aktivität der sequentiellen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* kann einfach und schnell mit Hilfe von photometrischen Fertigtests (Glucose und Cyanid) bestimmt werden. Die Berechnung der Aktivität der sequentiellen Diglucosidase erfolgte über die in Kapitel 2.7.2 angegebene Formel.

Einfluß des pH-Wertes auf die Aktivität der sequentiellen Diglucosidase

Für die nachfolgenden kinetischen Charakterisierungen des untersuchten Enzyms war es notwendig, die Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert der Inkubationslösungen zu bestimmen, um im späteren Inkubationsansatz den optimalen pH-Wert einzusetzen.

Für diese Untersuchungen wurde ein partiell gereinigtes Enzympräparat (Reinigung bis einschließlich Kapitel 2.3.3) verwendet. Die Enzymlösung wurde mit dem Substrat Amygdalin bei pH-Werten von 3,5 – 8,5 inkubiert (Abbildung 9). Die Aktivitätsbestimmung erfolgte über die Messung der freigesetzten Glucose- und Cyanidmengen.

Abbildung 9: Abhängigkeit der Aktivität der sequentiellen Diglucosidase vom pH-Wert



Legende zu Abbildung 9:

Ein über Kationenaustauscher gereinigter Hochsalzproteinextrakt (siehe Kapitel 2.3.3) einer Aufarbeitung von Blättern aus *Hevea brasiliensis* wurde bei verschiedenen pH-Werten (Variation von 3,5 bis 8,5) in einem McIlvaine-Puffer mit Amygdalin als Substrat (Substratkonzentration im Reaktionsansatz: 6 mM) auf die Aktivität der sequentiellen Diglucosidase getestet (siehe Kapitel 2.7.3.1). Die Bestimmung der Aktivität der sequentiellen Diglucosidase erfolgte über die freigesetzten, gemäß Kapitel 2.7.2 korrigierten Glucose- und Cyanidkonzentrationen. Jeder Meßpunkt entspricht dem Mittelwert aus drei Enzymmessungen. Die Standardabweichung lag dabei unter 5 %.

Die gemessene pH-Kurve zeigt den charakteristischen Verlauf für eine enzymatische Reaktion mit einem pH-Optimum der sequentiellen Diglucosidase von 5,5.

Warnecke (1995) konnte für die sequentielle Diglucosidase aus *Manihot esculenta* einen sehr ähnlichen Kurvenverlauf mit einem pH-Optimum von 5,0 feststellen.

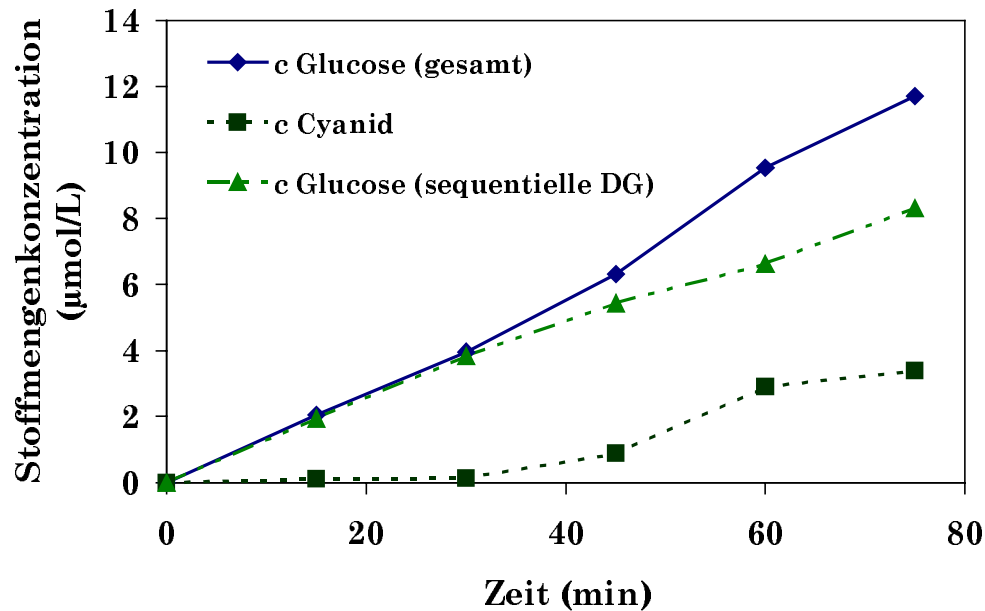
Die in der Literatur beschriebenen und gereinigten Diglucosidasen weisen ebenfalls ein pH-Optimum im sauren Bereich auf. Die von Kuroki und Poulton (1986) charakterisierte Amygdalin-Hydrolase aus Samen von *Prunus serotina* hat ihr pH-Optimum in McIlvaine-Puffern bei 4,5 – 5,0. Fan und Conn (1985) bestimmten für die Linustatinase aus *Linum usitatissimum* im Phosphat-Puffer einen für die enzymatische Reaktion optimalen pH-Bereich von 4 – 6.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die beschriebenen Diglucosidasen in einen breiten pH-Bereich aktiv sind.

Einfluß der Inkubationszeit auf die Aktivität der sequentiellen Diglucosidase

Die tatsächliche Enzymaktivität einer Inkubation wird durch die ermittelte Umsatzgeschwindigkeit nur dann wiedergegeben, wenn die Umsatzgeschwindigkeit während der gesamten Inkubationszeit konstant bleibt. In Abbildung 10 wird der Verlauf der bestimmten Enzymaktivitäten der sequentiellen Diglucosidase während unterschiedlicher Inkubationszeiten eines Ansatzes deutlich.

Abbildung 10: Abhängigkeit der Aktivität der sequentiellen Diglucosidase von der Inkubationszeit



Legende zu Abbildung 10:

Ein über Kationenaustauscher gereinigter Hochsalzproteinextrakt (Kapitel 2.3.3) einer Aufarbeitung von Blättern aus *Hevea brasiliensis* wurde bei unterschiedlichen Inkubationszeiten (Variation von 0 bis 75 min) in einem McIlvaine-Puffer (pH 5,5) bei einer Temperatur von 30 °C mit Amygdalin als Substrat auf die Aktivität der sequentiellen Diglucosidase getestet (siehe Kapitel 2.7.3.2). In der Abbildung 10 sind die Stoffmengenkonzentrationen der insgesamt gebildeten Glucose, des Cyanids und die aus der Differenz beider Werte berechnete Glucosespaltung, die aus der Aktivität der sequentiellen Diglucosidase herrührt, gegen die Zeit aufgetragen (siehe Kapitel 2.7.2).

Jeder Meßpunkt entspricht dem Mittelwert aus drei Enzymmessungen. Die Standardabweichung lag dabei unter 5 %.

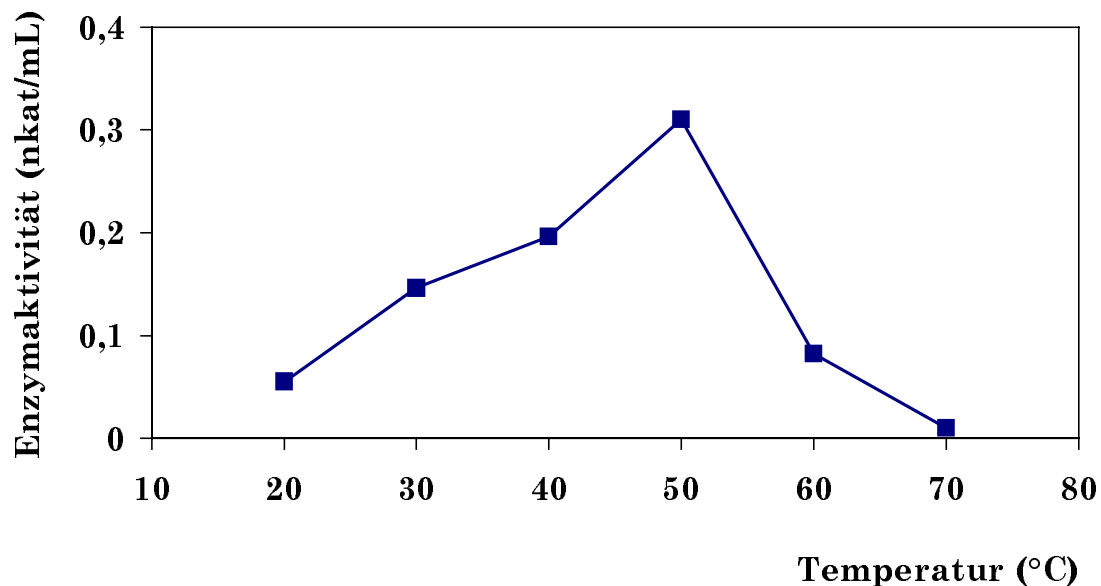
Die Abbildung zeigt einen linearen Zusammenhang zwischen der Glucosekonzentration (in der Abbildung mit "c Glucose (sequentielle Diglucosidase)" bezeichnet) und der Inkubationszeit. Die Werte der Glucosefreisetzung wurden entsprechend der Formel aus Kapitel 2.7.2 korrigiert, um die Aktivität der sequentiellen Diglucosidase in bezug auf das Substrat Amygdalin zu bestimmen. Ab einer Inkubationszeit von 30 min war ein Anstieg der Umsatzgeschwindigkeit in bezug auf die gesamte freigesetzte Glucosemenge festzustellen. Diese Erhöhung der gesamten Glucosefreisetzung ist durch folgende Beobachtung zu begründen. In den ersten 30 Minuten der Inkubation war nur eine sehr geringe Cyanidfreisetzung nachweisbar. Die sequentielle Diglucosidase spaltete von dem

als Substrat verwendeten cyanogenen Diglucosid Amygdalin das terminale Glucosemolekül ab, und es kam zur Bildung des Monoglucosids Prunasin. Das Enzym spaltet aber nicht nur cyanogene Diglucoside mit aromatischen Aglyka sondern auch die entsprechenden Monoglucoside weiter in die instabilen α -Hydroxynitrile und ein weiteres Glucosemolekül. Da zu Beginn der Inkubation kein Monoglucosid in der Lösung vorhanden war, war die Prunasin-Hydrolase Aktivität der sequentiellen Diglucosidase gleich null. Erst nach etwa 30 minütiger Inkubation war die Spaltung des Monoglucosids Prunasin durch freigesetztes Cyanid nachweisbar (Kapitel 2.7.2.3), und es kam durch die Hydrolyse beider Glucosemoleküle zu einem verstärkten Anstieg der Glucosekonzentration. Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß der Standardinkubationsansatz gemäß Kapitel 2.7.2 mit einer Inkubationszeit von 60 Minuten bei 30 °C keine Substratverknappung zeigt. Die Stabilität der sequentiellen Diglucosidase während der Inkubationszeit wird nicht beeinflußt.

Temperaturabhängigkeit der sequentiellen Diglucosidase aus Hevea brasiliensis

Um die Temperaturabhängigkeit der sequentiellen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* zu bestimmen, erfolgte die Inkubation mit einer, gemäß dem Reinigungsschema bis zum Kationenaustauscher gereinigten sequentiellen Diglucosidase (siehe Kapitel 2.3.3). In Abbildung 11 ist die Veränderung der Aktivität des Enzyms bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen dargestellt.

Abbildung 11: Abhängigkeit der Aktivität der sequentiellen Diglucosidase von der Temperatur



Legende zu Abbildung 11:

Eine über Kationenaustauscher gereinigte Hochsalzproteinfraktion einer Aufarbeitung von Blättern aus *Hevea brasiliensis* wurde bei dem pH-Optimum von 5,5, einer Inkubationszeit von 60 Minuten und einer Variation der Temperatur von 20 – 70 °C in einem McIlvaine-Puffer mit Amygdalin als Substrat (Substratkonzentration im Reaktionsansatz: 6 mM) auf die Aktivität einer sequentiellen Diglucosidase getestet (siehe Kapitel 2.7.3.3). Die Bestimmung der Aktivität erfolgte über die freigesetzten gemäß Kapitel 2.7.2 korrigierten Glucose- und Cyanidkonzentrationen.

Jeder Meßpunkt entspricht dem Mittelwert aus drei Enzymmessungen. Die Standardabweichung lag dabei unter 5 %.

Die sequentielle Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* ist über einen weiten Temperaturbereich aktiv. Die maximale Umsatzgeschwindigkeit lag unter den gewählten Versuchsparametern bei einer Inkubationstemperatur von 50 °C. Warnecke (1995) konnte für die sequentielle Diglucosidase aus *Manihot esculenta* eine maximale Umsetzung bei einer Inkubationstemperatur von 40 °C bestimmen.

Zur Bestimmung der Aktivität der sequentiellen Diglucosidase im Standardinkubationsansatz (gemäß Kapitel 2.7.2) wurde jedoch eine Temperatur von 30 °C verwendet. Bei diesen Bedingungen ist gewährleistet, daß es keine Verluste der bei höheren Temperaturen flüchtigen Blausäure gibt.

Einfluß von Aktivatoren auf die Aktivität der sequentiellen Diglucosidase

Um den Einfluß von Effektoren zu untersuchen, die die Aktivität eines Enzyms *in vitro* stabilisieren oder aktivieren, wurden Inkubationen unter Standardbedingungen (Kapitel 2.7.2) mit einer gereinigten Kationenaustauscherfraktion (Kapitel 2.3.3) aus Blättern von *Hevea brasiliensis* unter Zusatz verschiedener Substanzen, die bei einer Enzymreinigung nützlich sein könnten, mit Amygdalin als Substrat durchgeführt. Folgende Stoffen wurden eingesetzt: Chelatbildner wie EDTA, Antioxidantien wie Ascorbinsäure, bivalente Ionen wie Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Puffersubstanzen wie Triethanolamin, Imidazol, Histidin, Bakterizide wie NaN_3 und die Tenside SDS bzw. Triton X. Die Ergebnisse dieser Inkubationen sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Einfluß verschiedener Effektoren auf die Aktivität der sequentiellen Diglucosidase

Effektor	Aktivität der sequentiellen Diglucosidase (%)
Kontrolle	100
EDTA	91
Ascorbinsäure	120
CaCl_2	100
MgCl_2	98
MnCl_2	213
CoCl_2	62
Triethanolamin	49
Imidazol	0
Histidin	103
NaN_3	72
SDS	4
Triton X-100	95

Legende zu Tabelle 4:

Die Aktivität der sequentiellen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* wurde im Standardinkubationsansatz gemäß Kapitel 2.10.1 und 2.10.3 mit Amygdalin als Substrat (6 mM) bestimmt. Als Enzympräparat wurde eine gereinigte Kationenaustauscherfraktion (Kapitel 2.3.3) verwendet. Die aufgeführten Werte sind das Ergebnis aus den Mittelwerten von drei Messungen. Die Standardabweichung lag dabei unter 5 %.

Die getesteten Effektoren beeinflussten die Aktivität der sequentiellen Diglucosidase unterschiedlich. Der Zusatz von EDTA und Ascorbinsäure hatte kaum einen Einfluß auf die Aktivität. Bei den untersuchten bivalenten Ionen zeigte sich ebenfalls kein Effekt, nur beim Zusatz von Manganchlorid war eine Verdoppelung der Aktivität zu beobachten. Auch die anderen zugesetzten Ionen hatten keinen Einfluß; die Ausnahme bildete Kobalt (Hemmung der Aktivität um 38 %). Die Puffersubstanzen Triethanolamin und Imidazol, die häufig als Medien für die Chromatographie eingesetzt werden, sind im Fall der sequentiellen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* aufgrund ihrer Aktivitätshemmung nicht geeignet. Histidin dagegen zeigte, daß es als Puffersubstanz gut verwendbar wäre. Der Einsatz des Bakterizides Natriumazid während der Reinigung war leider nicht möglich, da die Aktivität der sequentiellen Diglucosidase dadurch negativ beeinflusst wurde. Die Tenside SDS bzw. Triton X-100 zeigten eine ganz unterschiedliche Wirkung auf die Aktivität des Enzyms. SDS hemmte die Aktivität um 96 %, Triton X-100 hingegen zeigte keinen Einfluß.

Bilanzierend ist festzustellen, daß Manganchlorid die einzige untersuchte Substanz ist, die einen deutlich positiven Einfluß auf die Aktivität der sequentiellen Diglucosidase hat.

Einfluß von Proteasehemmstoffen auf die Aktivität der sequentiellen Diglucosidase

Bei der Reinigung eines Enzyms aus pflanzlichen Materialien ist es wichtig, zu untersuchen, ob die gemessene Aktivität in den unterschiedlichen Blattentwicklungsstadien (siehe Kapitel 3.1.4) durch eine entwicklungsbedingte Verminderung verursacht wird oder durch den Einfluß von Proteaseaktivitäten während der Aufarbeitung bedingt ist.

Es wurde eine Aufarbeitung (gemäß Kapitel 2.2.1) aus adulten Blättern (Stadium D) von *Hevea brasiliensis* vergleichend mit und ohne Zusatz von Proteasehemmstoffen durchgeführt. Folgende Inhibitoren (jeweils 0,5 mM im Standardinkubationsansatz) wurden als Gemisch verwendet: Pepstatin A (gegen Aspartylproteasen), Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (gegen Serinproteasen) und Iodessigsäure (gegen Cysteinproteasen).

Die bestimmten Aktivitäten der sequentiellen Diglucosidase (Kapitel 2.7.2) in den Nieder- und Hochsalzproteinextrakten aus adulten *Hevea*-Blättern sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Aktivität der sequentiellen Diglucosidase in Aufarbeitungen aus *Hevea*-Blättern des Blattstadiums D mit und ohne Zusatz von Proteaseinhibitoren

	Sequentielle Diglucosidase (pkat/g FG)					
	Niedersalzextrakt			Hochsalzextrakt		
Blattstadium	Glucose (gesamt)	Cyanid	Glucose (seq. DG)	Glucose (gesamt)	Cyanid	Glucose (seq. DG)
D (ohne Inhibitoren)	0	0	0	137,3	67,7	69,6
D (mit Inhibitoren)	0	0	0	91,5	28,1	63,4

Legende zu Tabelle 5:

Es wurden Enzymextrakte aus *Hevea*-Blättern des Blattstadiums D gemäß Kapitel 2.2.1.1 und 2.2.1.2 mit und ohne Zusatz von Proteaseinhibitoren (Pepstatin A, Phenylmethylsulfonylfluorid und Iodessigsäure; jeweils 0,5 mM im Standardinkubationsansatz) hergestellt. Die Enzymaktivität der sequentiellen Diglucosidase wurde gemäß Kapitel 2.7.2 mit Amygdalin als Substrat (6 mM) bestimmt und unter Verwendung der dort angegebenen Korrekturformel berechnet.

Die Bestimmung der Aktivität der sequentiellen Diglucosidase lieferte mit und ohne Zusatz von Proteaseinhibitoren denselben Wert. Daher war auszuschließen, daß Proteasen und Proteasehemmstoffe einen Einfluß auf die Aktivität der sequentiellen Diglucosidase hatten. Folglich wurde auf den Einsatz dieser Stoffe bei den Enzympräparationen verzichtet.

3.1.11 Stabilitätsuntersuchungen der sequentiellen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis*

Die sequentielle Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* wurde auf ihre Stabilität bei unterschiedlichen Lagerbedingungen untersucht. Die gemäß Kapitel 2.2.1.2 hergestellten Hochsalzproteinextrakte erwiesen sich beim Einfrieren bei – 18 °C als sehr stabil. Das Einfrieren und Lagern bereits aufgearbeiteter Enzympräparationen stellt somit eine geeignete Möglichkeit dar, um jederzeit aktive Enzymfraktionen für unterschiedliche Testsysteme zur Verfügung zu haben. Die Lage-

rung bei + 4 °C im Kühlschrank erwies sich als ungeeignet, da nach 10 Tagen eine Abnahme der Aktivität um 70 % zu verzeichnen war.

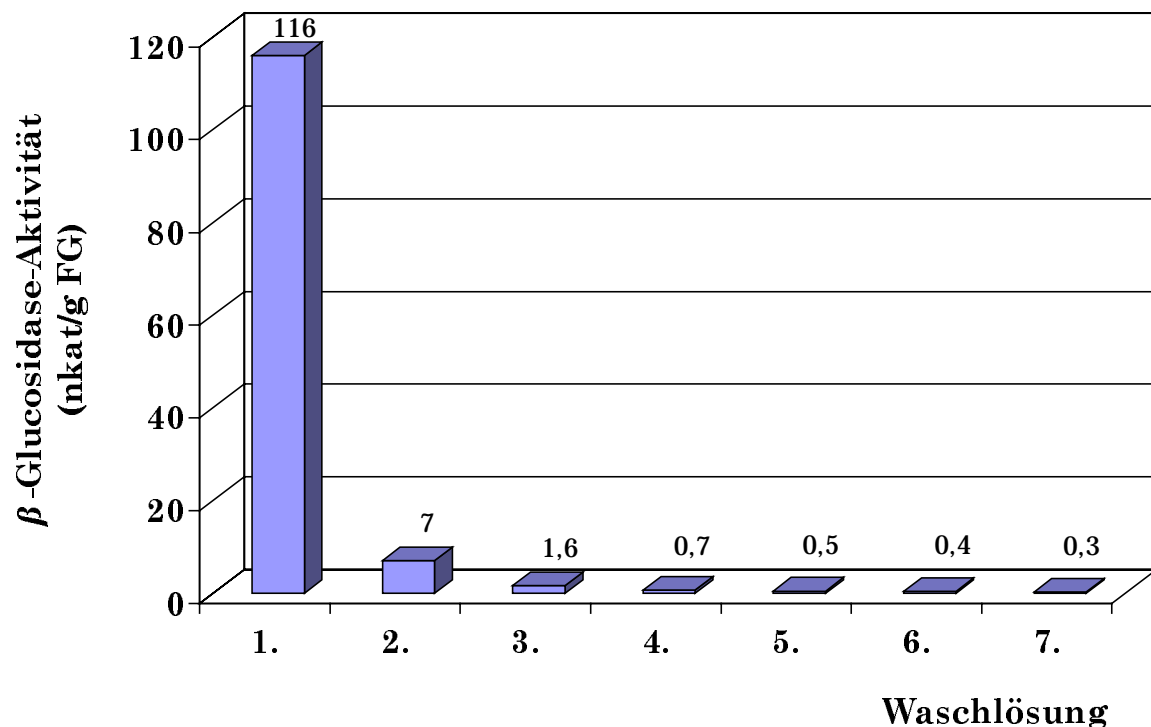
3.2 Reinigung der sequentiellen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis*

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war die Reinigung und die biochemische Charakterisierung der sequentiellen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* bis zur elektrophoretischen Homogenität. In den folgenden Kapiteln werden die einzelnen Reinigungsschritte der sequentiellen Diglucosidase aus einem Hochsalzproteinextrakt dargestellt. In den Kapiteln 2.6 bzw. 3.6 sind zusätzlich die Versuche zur Reinigung der sequentiellen Diglucosidase aufgeführt, die keine Erhöhung des Reinigungsfaktors erbracht haben und deshalb bei der Präparation des Enzyms nicht weiter verwendet wurden. Da jedoch das Bindungsverhalten der sequentiellen Diglucosidase an unterschiedliche Chromatographiemedien interessante Daten zur Charakterisierung dieses Enzyms liefert, wurden die Versuche mit in diese Arbeit integriert.

1. Homogenisation, Ammoniumsulfatfällung und Dialyse

Die Reinigung der sequentiellen Diglucosidase erfolgte aus Blättern von *Hevea brasiliensis* des Blattentwicklungsstadiums B – C (Kapitel 2.1.1.1), da sich in diesen Blättern die höchste Aktivität der sequentiellen Diglucosidase nachweisen ließ (Kapitel 3.1.2). In den hergestellten Hochsalzextrakten (Kapitel 2.2.1.2) ließen sich auch nach siebenmaligem Waschen des Homogenisationsrückstandes mit hypotonischem Extraktionspuffer noch die Aktivität der β -Glucosidase (Linamarase) nachweisen (Kapitel 3.1.8). Diese Restaktivität des Enzyms in der letzten Waschlösung stellte aber nur 0,3 % der in der ersten Waschlösung enthaltenen β -Glucosidase (Linamarase) dar. In Abbildung 12 ist die Abnahme der Aktivität der Linamarase in den verschiedenen Waschlösungen dargestellt.

Abbildung 12: Reduktion der β -Glucosidase-Aktivität in den Waschlösungen der Homogenisationsrückstände



Legende zu Abbildung 12:

Es wurde eine Aufarbeitung aus *Hevea*-Blättern gemäß Kapitel 2.2.1 durchgeführt. Die dabei entstandenen Waschlösungen der Homogenisationsrückstände wurden jeweils gesammelt und die Aktivität der β -Glucosidase (Linamarase) bestimmt (Kapitel 2.7.2.4).

Das mehrmalige Waschen der Homogenisationsrückstände mit hypotonischer Pufferlösung führte zu einer drastischen Reduktion der Aktivität der β -Glucosidase (Linamarase) aus *Hevea brasiliensis* im Hochsalzextrakt.

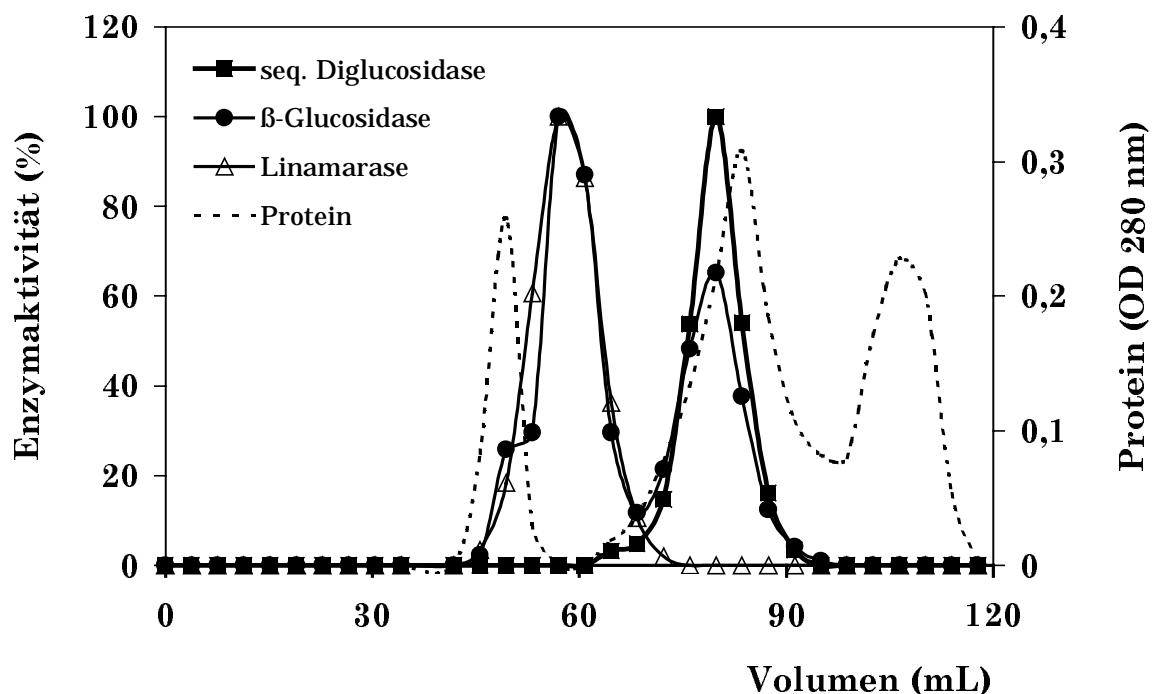
Durch die anschließende Behandlung der gewaschenen Zellwandrückstände unter Hochsalzbedingungen (1,2 M Natriumchlorid) ließ sich die sequentielle Diglucosidase aus *Hevea*-Blättern extrahieren. Diese Fraktion enthielt eine sequentielle Diglucosidase, die durch eine 80 %ige Ammoniumsulfatfällung konzentriert und durch eine Dialyse gegen einen Phosphat-Puffer (0,001 M; mit 1,2 M Natriumchlorid) von niedermolekularen Stoffen gereinigt wurde. Bei der Ammoniumsulfatfällung kam es in bezug auf die spezifische Aktivität der sequentiellen Diglucosidase zu einer Reduktion von etwa 25 % (siehe Tabelle 7, Seite 86). Die Konzentrierung der Proteine durch die $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung wurde im Reinigungsschema der sequentiellen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* dennoch beibehalten. Andere Konzentrierungsverfahren für Proteine waren zwar

möglich (z. B. im analytischen Maßstab mit den Centriprep®-Konzentratoren, Fa. Amicon), aber bei dem großen Flüssigkeitsvolumen einer Aufarbeitung hätten diese Schritte zu viel Zeit beansprucht. Ein zusätzlicher Vorteil der Ammoniumsulfatfällung bestand außerdem in der Abtrennung der endogenen cyanogenen Substanzen.

2. Gelfiltration

Die nach der Dialyse erhaltenden Proteinfraktionen wurden über eine Gelfiltration (Superdex 200®) aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe aufgetrennt (Kapitel 2.3.2). Dieses Gelmaterial hat ein Ausschlußvolumen von 600 kDa und liefert eine optimale Trennung der Proteine im Bereich von 10 bis 600 kDa. Der durchgeführte Reinigungsschritt war geeignet, die in dem Hochsalzproteinextrakt enthaltene Restaktivität der β -Glucosidase (Linamarase) (Kapitel 3.1.6) zum größten Teil zu entfernen. Die eluierten Fraktionen der Gelfiltration wurden durch den Einsatz der unterschiedlichen Substrate Amygdalin, Linamarin und p-NPG auf die jeweiligen Enzymaktivitäten getestet (siehe Abbildung 13).

Abbildung 13: Gelfiltration einer Hochsalzrohprotein-Lösung aus Blättern von *Hevea brasiliensis*



Legende zu Abbildung 13:

Die Hochsalz-Rohproteinlösung einer Aufarbeitung aus *Hevea*-Blättern (Kapitel 2.3.1) wurde über eine Superdex 200®-Säule (Fa. Pharmacia) aufgetrennt. Fließmittel: McIlvaine-Puffer; 15 mM; pH 5,6; 100 mM NaCl. Die Aktivität der sequentiellen Diglucosidase wurde über die Spaltung des cyanogenen Diglucosids Amygdalin ermittelt (Kapitel 2.7.2). Die β -Glucosidase-Aktivität wurde über die Spaltung von p-Nitrophenyl- β -D-glucosid (Kapitel 2.7.2.4) bestimmt. Die Linamarase-Aktivität der β -Glucosidase entspricht der Spaltung von Linamarin (Kapitel 2.7.2.5). Das Fraktionsvolumen betrug je 3,8 mL. Enzymaktivitäten: Diglucosidase: 100 % = 0,63 nkat/mL; β -Glucosidase: 100 % = 5,4 nkat/mL; Linamarase: 100 % = 3,53 nkat/mL.

Als Substrate wurden erstens das cyanogene Diglucosid Amygdalin, zweitens das cyanogene Monoglucosid Linamarin und drittens das künstliche Substrat p-Nitrophenyl- β -D-glucosid (p-NPG) eingesetzt. Die Spaltung des cyanogenen Diglucosids Amygdalin zeigte nur im Bereich der Aktivität der sequentiellen Diglucosidase ein Maximum im Elutionsprofil. Auch die Hydrolyse des cyanogenen Monoglucosids Linamarin wies nach der Inkubation der eluierten Fraktionen nur ein Aktivitätsmaximum auf, welches im Elutionsbereich der β -Glucosidase lag. Die Spaltung des artifiziellen Substrates p-NPG durch die eluierten Fraktionen der Gelfiltration zeigte hingegen zwei Aktivitätsmaxima. Das erste Maximum ist der Aktivität der β -Glucosidase (Linamarase) zuzuordnen, das zweite Maximum der sequentiellen Diglucosidase. Die sequentielle Diglucosidase

aus *Hevea brasiliensis* hydrolysiert somit das künstliche Substrat p-NPG. Fan und Conn (1985) sowie Kuroki und Poulton (1986) zeigten ebenfalls, daß die von ihnen beschriebenen Hydrolasen (Diglucosidasen) das synthetische Substrat p-NPG sehr effektiv spalten.

Als Folge dieses Reinigungsschrittes über die gewählte Gelfiltrationssäule wurden mehr als 70 % des aufgetragenen Proteins abgetrennt, während gleichzeitig die Aktivität der sequentiellen Diglucosidase nach der Trennung vollständig erhalten blieb (Bilanzierung dieses Reinigungsschrittes: Kapitel 3.3, Tabelle 7, Seite 86).

3. Konzentrierung und Umpuffern der Proteinlösung mit Aktivität einer sequentiellen Diglucosidase

Um eine Enzymreinigung effektiv durchführen zu können, ist es wichtig, daß Möglichkeiten zur Umpufferung und Konzentrierung der aktiven Enzymfraktionen gefunden werden. Für diesen Zweck wurden verschiedene Verfahren getestet:

- eine Ammoniumsulfatfällung mit anschließender Dialyse,
- eine Ultrafiltration und
- das Einengen der Proteinlösung mit sogenannten Konzentratoren.

Eine weitere Ammoniumsulfatfällung z. B. nach einer Gelfiltration eignete sich nicht zum Einengen der Enzymlösungen, da die Proteinkonzentration in den Lösungen zu gering war und sich nach der Fällung kein Proteinsediment abzentrifugieren ließ. Außerdem wurde die Aktivität der sequentiellen Diglucosidase durch die Fällung mit Ammoniumsulfat beeinträchtigt (Tabelle 7, Seite 86). Des weiteren war eine Dialyse mit einer Enzymlösung, in der die Aktivität der sequentiellen Diglucosidase nachweisbar war, nur dann durchzuführen, wenn dem Dialysepuffer ein Natriumchloridanteil von ca. 1 M zugesetzt wurde (Kapitel 2.3.1). Ansonsten kam es zu einer Adsorption der sequentiellen Diglucosidase an den Dialyseschlauch. Um dieses Adsorptionsverhalten des Enzyms an verschiedene Dialyse- bzw. Ultrafiltrationsmembranen zu überprüfen, wurden Enzymlösungen mit den entsprechenden Membranen inkubiert, zentrifugiert

und anschließend die Aktivität im Überstand bestimmt (Kapitel 2.12). Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Adsorption der sequentiellen Diglucosidase an Membranmaterialien

	Kontrolle	Dialysemembran	Ultrafiltrationsmembran	Konzentratormembran
Aktivität der sequentiellen Diglucosidase im Überstand	100 % (0,84 nkat)	56,9 % (0,48 nkat)	28,6 % (0,24 nkat)	98,1 % (0,82 nkat)
Zusatz von 1 M NaCl während der Inkubation	100 % (0,84 nkat)	100 % (0,84 nkat)	26,7 % (0,22 nkat)	98,3 % (0,83 nkat)

Legende zu Tabelle 6:

Die Versuche zur Adsorption der sequentiellen Diglucosidase an Membranmaterial in Pufferlösung mit und ohne Zusatz von NaCl wurde gemäß Kapitel 2.12.1 durchgeführt. Als Membranen wurden verwendet: 1. Dialysemembran (Cellophan® aus regenerierter Cellulose; Fa. Serva), 2. Ultrafiltrationsmembran (Material auf Polysulfonbasis, Fa. Millipore) und 3. Konzentratormembran (synthetische Polymere aus hydrophilem Material; Fa. Amicon). Nach der Inkubation mit den Membranen wurde die Lösung abgetrennt, ein Standardinkubationsansatz gemäß Kapitel 2.7.2 mit Amygdalin durchgeführt und anschließend die freigesetzte Glucose- und Cyanidmenge bestimmt. Die angegebenen Aktivitätswerte der sequentiellen Diglucosidase wurde mit der angegebenen Formel (Kapitel 2.7.2) korrigiert.

Die sequentielle Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* adsorbierte stark an die untersuchten Dialyse- bzw. Ultrafiltrationsmembranen. Diese Adsorption an das Material ließ sich bei der Dialysemembran durch Zusatz von 1 M NaCl wieder rückgängig machen. Deshalb wurde die Dialyse (gemäß Kapitel 2.3.1) unter Zusatz von Natriumchlorid (1,2 M) durchgeführt.

Die Adsorption an das Material der Ultrafiltrationsmembran (Ausschlußgrenze von 10 kDa) ließ sich dagegen auch nicht durch Zusatz von Salz aufheben. Das Material auf Polysulfonbasis führte zu Verlusten der Aktivität des Enzyms im Überstand. Bei den Membranbestandteilen handelt es sich um ein polares Material, welches durch ionische Wechselwirkungen mit der sequentiellen Diglucosidase interagierte und offenbar zu einer nicht reversiblen Bindung des Enzyms führte. Aus diesem Grund wurde auf den Einsatz der Ultrafiltration zum Konzentrieren und Umpuffern der Proteinlösungen verzichtet.

Als geeignetes Verfahren erwies sich die Verwendung von sogenannten Konzentratoren (Centriprep 30[®] (Volumen bis 15 mL) oder Microcon 30[®] (Volumen bis 500 μ L), Trenngrenze: 30.000 Dalton, Fa. Amicon). Das verwendete Membranmaterial (synthetische Polymere aus hydrophilem Material) zeigte keinerlei Interaktion mit der sequentiellen Diglucosidase und die Aktivität des Enzyms blieb beim Konzentrieren und Umpuffern vollständig erhalten.

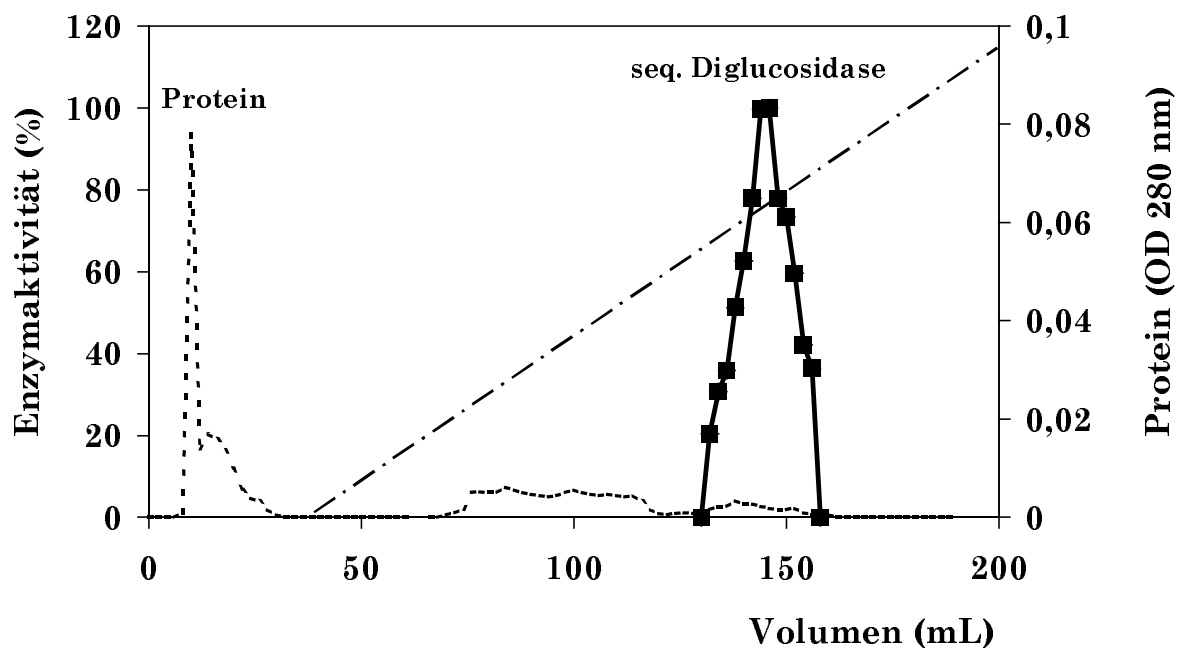
4. Kationenaustauscherchromatographie mit CM Bio-Gel A-Agarose[®]

Die konzentrierten und auf den Chromatographiepuffer der Kationenaustauscherchromatographie umgepufferten Proteinproben der Gelfiltration, in der die Aktivität der sequentiellen Diglucosidase enthalten war, wurden auf eine Kationenaustauschersäule aufgetragen. Unter den gewählten Chromatographiebedingungen wurde der größte Anteil des aufgetragenen Proteingemisches im Ausschlußvolumen eluiert. Die sequentielle Diglucosidase wurde an die CM Bio-Gel A-Agarose[®]-Säule gebunden und erst durch einen Gradienten mit dem chaotropen Salz Lithiumchlorid eluiert. Die Verwendung eines Natriumchlorid-Gradienten zur Proteinelution der sequentiellen Diglucosidase erwies sich als nicht geeignet.

Der Reinigungsschritt mit diesem Ionenaustauscher war sehr effektiv, da ein Großteil der Proteine, die keine Aktivität gegenüber cyanogenen Diglucosiden besitzen, abgetrennt wurde. Ein weiterer Vorteil war die vollständige Abtrennung der Restaktivität der Linamarase. Dies konnte bei der Inkubation der aufgefangenen Fraktionen mit dem cyanogenen aliphatischen Diglucosid Linu-
statin gezeigt werden. Es ließ sich kein Cyanid, welches durch die Aktivität einer β -Glucosidase (Linamarase) gebildet würde, mehr nachweisen. Der positive Nachweis des cyanogenen Monoglucosids Linamarin als Spaltungsprodukt der sequentiellen Diglucosidase wurde in Kapitel 3.1.7 durch die HPLC-Analytik geführt.

Das Elutionsprofil des Kationenaustauschers ist in Abbildung 14 dargestellt. Die Bilanzierung dieses Reinigungsschrittes ist in Kapitel 3.3, Tabelle 7, Seite 86 aufgezeigt.

Abbildung 14: Elutionsprofil der Kationenaustauscher-Chromatographie mit einer CM Bio-Gel A-Agarose®-Säule



Legende zu Abbildung 14:

Die Diglucosidase-Fractionen der Gelfiltration (Kapitel 2.3.2) aus *Hevea brasiliensis* wurden mittels Konzentratoren (Centriprep 30®, Fa. Amicon) eingengt, auf einen Natriumacetat-Puffer (20 mM; pH 5,0) eingestellt und auf eine CM Bio-Gel A-Agarose®-Säule (Fa. BIORAD) aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem Lithiumchlorid-Gradienten (0 – 150 mM). Die Aktivität der sequentiellen Diglucosidase wurde über die Spaltung des cyanogenen Diglucosids Amygdalin ermittelt (Kapitel 2.7.2). Das Fraktionsvolumen betrug je 2,3 mL. Enzymaktivitäten:

Diglucosidase: 100 % = 78,2 pkat/mL.

Bei diesem Reinigungsschritt werden 98 % der aufgetragenen Proteinmenge abgetrennt. Trotz eines Verlustes bei der eluierten Aktivität von 70 % nimmt die spezifische Aktivität stark zu.

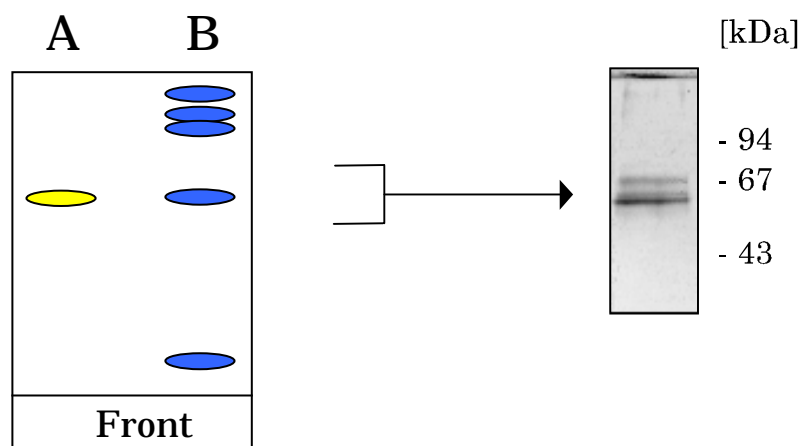
5. Analytische native kationische Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Als letzter Schritt der Reinigung der sequentiellen Diglucosidase wurde eine präparative native kationische Gelelektrophorese (Punkt 7.) durchgeführt, da die anderen verwendeten chromatographischen Trennmedien, die zur Reinigung eingesetzt wurden, nicht zu einer effektiven Erhöhung des Reinigungsfaktors geführt haben (siehe Kapitel 3.6).

Die folgenden elektrophoretischen Vorversuche wurden durchgeführt. Zuerst wurde eine bis einschließlich zur Kationenaustauscherchromatographie gereinigte aktive Enzymfraktion der sequentiellen Diglucosidase einer nativen

kationischen Elektrophorese im analytischen Maßstab unterworfen (Kapitel 2.5.2). Nach der Elektrophorese wurde das Gel in zwei identische Hälften geteilt, welche zwei verschiedenen Detektionsmethoden unterzogen wurden. Mit der ersten Hälfte des Gels wurde einer Aktivitätsfärbung mit 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucosid (Kapitel 2.5.8) durchgeführt. Die enzymatische Hydrolyse dieses Glucosides führt zur Freisetzung des Fluorochroms 4-Methylumbelliferon, so daß entsprechende aktive Enzyme als blau fluoreszierende Bande (Excitation bei 366 nm) detektiert werden können. In der zweiten Gelhälfte wurden die aufgetrennten Proteine mit Coomassie Brilliant Blue R-250[®] angefärbt (Kapitel 2.5.7). In Abbildung 15 sind die Ergebnisse der unterschiedlichen Detektionsmethoden der Gele schematisch dargestellt.

Abbildung 15: Unterschiedliche Detektion der sequentiellen Diglucosidase nach einer analytischen nativen kationischen Gelelektrophorese mit anschließender SDS-PAGE der aktiven Fraktionen



Legende zu Abbildung 15:

Auf der linken Seite ist schematisch das Ergebnis einer analytischen nativen kationischen Gelelektrophorese (Kapitel 2.5.2) dargestellt. Aufgetrennt wurde eine bis zur Kationenaustauscherchromatographie (Kapitel 2.3.3) gereinigte Enzymfraktion aus *Hevea*-Blättern. Das entwickelte Gel wurde geteilt und zur Detektion der aufgetrennten Proteine bzw. der Aktivität der sequentiellen Diglucosidase zwei unterschiedlichen Methoden unterworfen. In der Spur A des schematisch dargestellten Gels ist das Ergebnis der Inkubation mit 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucosid aufgeführt (Kapitel 2.5.8). In Spur B ist die Färbung der aufgetrennten Proteine mit Coomassie Brilliant Blue R-250[®] gezeigt (Kapitel 2.5.7). Die aufgetragene Proteinmenge betrug 10 μ g.

Das rechts dargestellte Gel zeigt das Bandenmuster einer SDS-PAGE (Kapitel 2.5.4) mit anschließender Silberfärbung (Kapitel 2.5.5). Aufgetrennt wurden die enzymatisch aktiven Fraktionen der analytischen nativen kationischen Gelelektrophorese (links schematisch dargestellt), die aus dem Gel eluiert wurden (Kapitel 2.5.2 und 2.5.3). Die Wanderungsstrecken des Molekulargewichtsstandards sind rechts neben dem Gel markiert.

Auf dem schematisch dargestellten Gel ist zu erkennen, daß sich auf der Höhe der fluoreszierenden Bande auch eine Proteinbande nachweisen ließ. Diese mit 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucosid angefärbte Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und zur Extraktion der Proteine (Kapitel 2.5.3) über Nacht bei 4 °C mit Puffer inkubiert. Die Lösung der so eluierten Proteine wurden eingengt und auf den Sammelgelpuffer der diskontinuierlichen SDS-PAGE (Kapitel 2.5.4) umpuffert. Die Elektrophorese lieferte nach Silberfärbung drei Proteinbanden mit Molekulargewichten im Bereich von 67, 59 und 57 kDa. Das erhaltende Proteinmuster des PAGE-Gels ist in Abbildung 15 dargestellt.

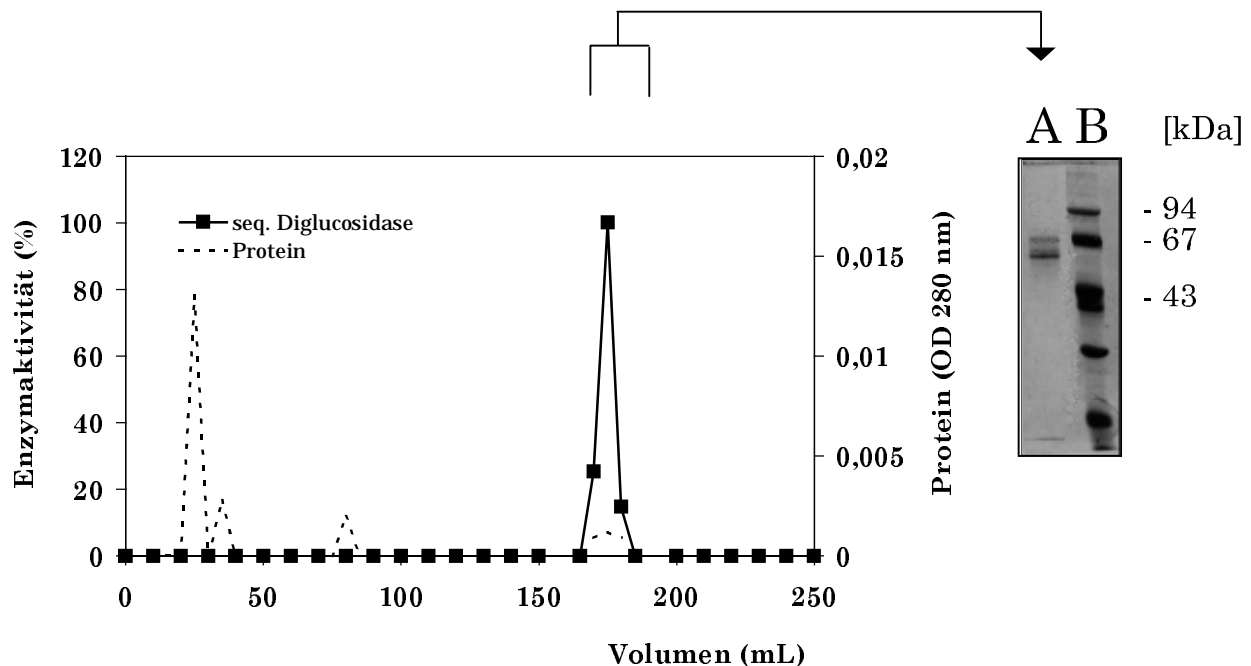
In diesem Zusammenhang stellt sich die folgende Frage: Sind neben der sequentiellen Diglucosidase noch andere Proteine in den aktiven und eingengten Fraktionen der analytischen nativen kationischen Elektrophorese enthalten? Ist dies nicht der Fall, so würde entweder ein Enzym mit drei Untereinheiten vorliegen oder das Proteinbandenmuster wäre auf die unterschiedliche Degradation von einer oder zwei Untereinheiten des Enzyms zurückzuführen. Um diesen Sachverhalt zu klären, wurde eine präparative native anionische Gelelektrophorese durchgeführt.

6. Präparative native anionische Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der durchgeführten anionischen elektrophoretischen Trennung gemäß Kapitel 2.5.1 mit TRIS/HCl als Puffersubstanzen wurde im Vergleich zum kationischen System nur ein Hundertstel der Aktivität der sequentiellen Diglucosidase eluiert. Entsprechend verhielten sich auch die Elutionszeiten in den beiden unterschiedlichen Gelsystemen. Unter kationischen Bedingungen erfolgte die Elution der sequentiellen Diglucosidase in ca. vier Stunden (Abbildung 17), unter anionischen Bedingungen erst nach 40 Stunden (Abbildung 16). Es wird deutlich, daß sich das anionische Gelsystem nicht für eine Enzymreinigung verwenden, sondern nur zur Klärung der Zusammensetzung des Enzyms einsetzen ließ. Dazu wurden die mit dem oben erwähnten, anionischen Gelsystem getrennten und aktiven Diglucosidase-Fraktionen eingengt und erneut elektrophoretisch über eine denaturierenden SDS-PAGE (Kapitel 2.5.4) mit anschließender Silberfärbung (Kapitel 2.5.5) analysiert. Das entsprechende Gel lieferte dasselbe Bandenmuster (Abbildung 16) wie das Gel, welches Proben enthielt, die mittels

analytischer nativer kationischer Elektrophorese aufgetrennt wurden (Abbildung 15).

Abbildung 16: Elutionsprofil der präparativen nativen anionischen Gelelektrophorese und anschließender SDS-PAGE



Legende zu Abbildung 16:

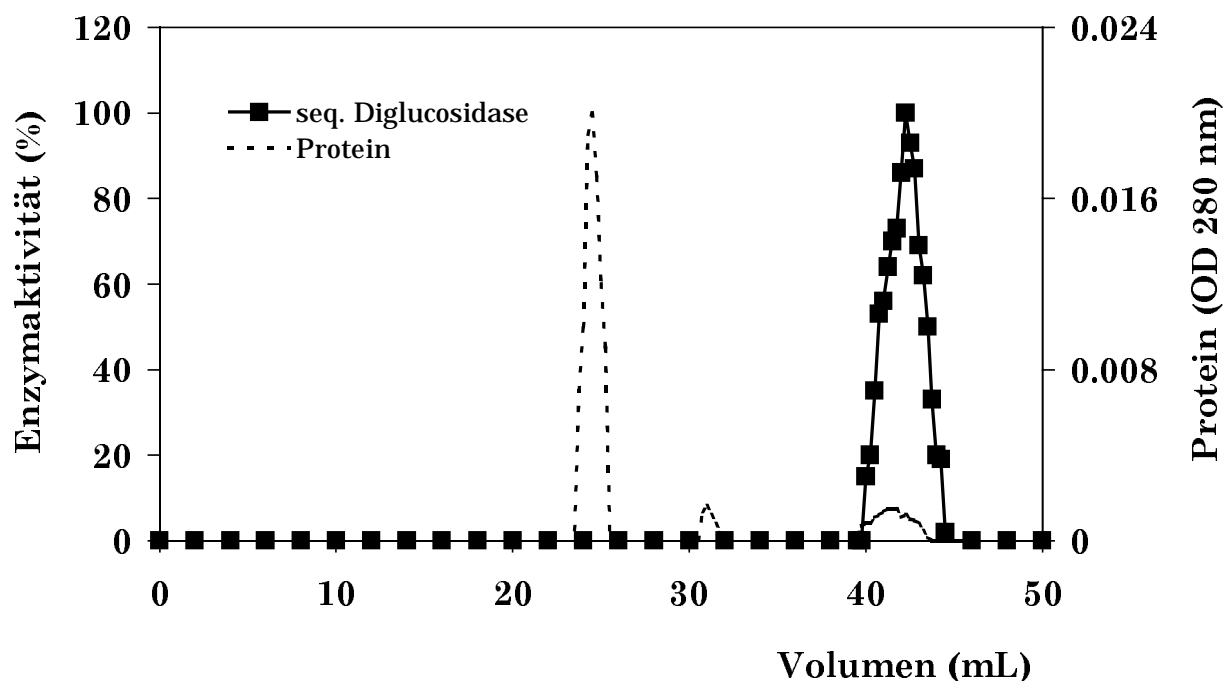
Auf der linken Seite ist das Elutionsprofil einer bis zur Kationenaustauscherchromatographie gereinigten Enzymfraktion (Kapitel 2.3.3) dargestellt, die gemäß Kapitel 2.5.1 auf ein präparatives natives anionisches Gelsystem aufgetragen und entwickelt wurde. Die eluierten aktiven Fraktionen wurden mit p-NPG gemäß Kapitel 2.5.1 in Mikrotiterplatten detektiert, eingengt und mit dem Denaturierungspuffer der SDS-PAGE (Kapitel 2.5.4) behandelt. Die eluierte Aktivität betrug 3 pkat/mL. Auf der rechten Seite ist in Spur A des Gels das Bandenmuster der sequentiellen Diglucosidase nach SDS-Elektrophorese und Silberfärbung (Kapitel 2.5.5) dargestellt. Die aufgetragene Aktivität der sequentiellen Diglucosidase betrug 10 pkat. In der rechten Spur B ist ein Molekulargewichtsstandard aufgetragen.

Da ausgeschlossen werden kann, daß zwei verschiedene Proteine sowohl in einem kationischen als auch in einem anionischen Elektrophorese-System genau die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit haben, ist zu folgern, daß in den aktiven Fraktionen der nativen Elektrophoresen nur die sequentielle Diglucosidase vorliegt. Da aber nicht ausgeschlossen ist, daß es sich bei den detektierten Proteinbanden zufällig um genau die gleichen Degradationsprodukte des Enzyms handelt, ist eine endgültige Aussage über die Natur der drei Untereinheiten (Molekulargewicht: 67, 59 bzw. 57 kDa) nicht möglich.

7. Präparative native kationische Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Ergebnisse der analytischen nativen kationischen Gelelektrophorese haben gezeigt, daß der Einsatz dieses Systems gut geeignet ist, um als letzter Reinigungsschritt der sequentiellen Diglucosidase eingesetzt zu werden. Dazu wurden die Fraktionen, die nach der Kationenaustauscherchromatographie (Kapitel 2.3.3) die aktiven Diglucosidase-Fraktionen enthielten, eingengt (Centriprep bzw. Microcon 30[®]-Konzentratoren (Fa. Amicon)), umgepuffert (Kapitel 2.3.4, mit 1:10 (v/v) verdünnten Elektrophorese-Puffer) und noch einmal stark eingengt (10 µL Probenvolumen). Als Elutionspuffer wurde der Elektrophoresepuffer des Gelsystems verwendet. In Abbildung 17 ist der Verlauf der präparativen Elektrophorese dargestellt.

Abbildung 17: Elutionsprofil der präparativen nativen kationischen Polyacrylamid-Gelelektrophorese



Legende zu Abbildung 17:

Die Diglucosidase-Fraktionen der Kationenaustauschersäule wurden mittels Konzentratoren (Centriprep 30[®], Fa. Amicon) eingengt, umgepuffert (35 mM β -Alanin; 14 mM Essigsäure; pH 4,5), auf eine Glycerinkonzentration von 20 % eingestellt und auf ein präparatives natives kationisches Gelsystem (7,7 %iges Trenngel) aufgetragen (Kapitel 2.3.4). Die Elution der getrennten Proteine erfolgte kontinuierlich mit dem Elektrophoresepuffer. Das Fraktionsvolumen war je 0,25 mL. Die Aktivität der sequentiellen Diglucosidase wurde über die Spaltung von p-Nitrophenyl- β -D-glucosid (Kapitel 2.3.4) in Mikrotiterplatten detektiert. Die eluierte Aktivität betrug 0,3 nkat/mL.

Nach Durchführung der präparativen nativen kationischen Elektrophorese wurden die Fraktionen zuerst mit dem cyanogenen Diglucosid Linustatin als Substrat auf die aktiven Fraktionen der sequentiellen Diglucosidase untersucht. Die anschließende Inkubation mit p-NPG ergab einen identischen Elutionsprofilverlauf. Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von Linustatin wurden die weiteren Untersuchungen der eluierten Fraktionen mit dem synthetischen Substrat p-Nitrophenyl- β -D-Glucosid durchgeführt.

Die Proteinfractionen mit Enzymaktivität der sequentiellen Diglucosidase wurden nach dem Beginn der Elektrophorese in einem Bereich von 40 bis 45 mL eluiert. Zwar fand während der sechsstündigen Elektrophorese eine Inaktivierung der Diglucosidase auf etwa 10 % der Ausgangsaktivität statt, doch wurden alle anderen noch in der Probe befindlichen Proteine abgetrennt, so daß die spezifische Aktivität während dieses Verfahrens erhalten blieb. Die Bilanzierung des Reinigungsschrittes ist in Tabelle 7, Seite 86 angegeben.

Die aktiven Fraktionen wurden mit einer denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (Kapitel 2.5.4) auf ihre Reinheit und Homogenität hin überprüft. Das erhaltene SDS-Gel zeigte nach Silberfärbung (Kapitel 2.5.5) drei Banden mit Molekulargewichten im Bereich von 67, 59 und 57 kDa, wie sie auch bei der analytischen nativen kationischen und der anionischen Elektrophorese ermittelt wurden.

Ein Teil der eingengten und aktiven Proteinproben wurde zu einer Inkubation mit dem cyanogenen Diglucosid Linustatin verwendet. Dabei zeigte sich, daß keine Cyanidfreesetzung nachzuweisen war, und somit nur eine Spaltung bis zum Monoglucosid stattgefunden hat.

3.3 Bilanzierung der Reinigungsschritte der sequentiellen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis*

In der folgenden Tabelle 7 wird der Verlauf und die Effektivität der einzelnen Reinigungsschritte der sequentiellen Diglucosidase noch einmal zusammenfassend dargestellt. Die entsprechende Bewertung in bezug auf eine Reinigungs-

effizienz wurde in den einzelnen Unterabschnitten des Kapitels 3.2 vorgenommen.

Tabelle 7: Reinigung der sequentiellen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis*

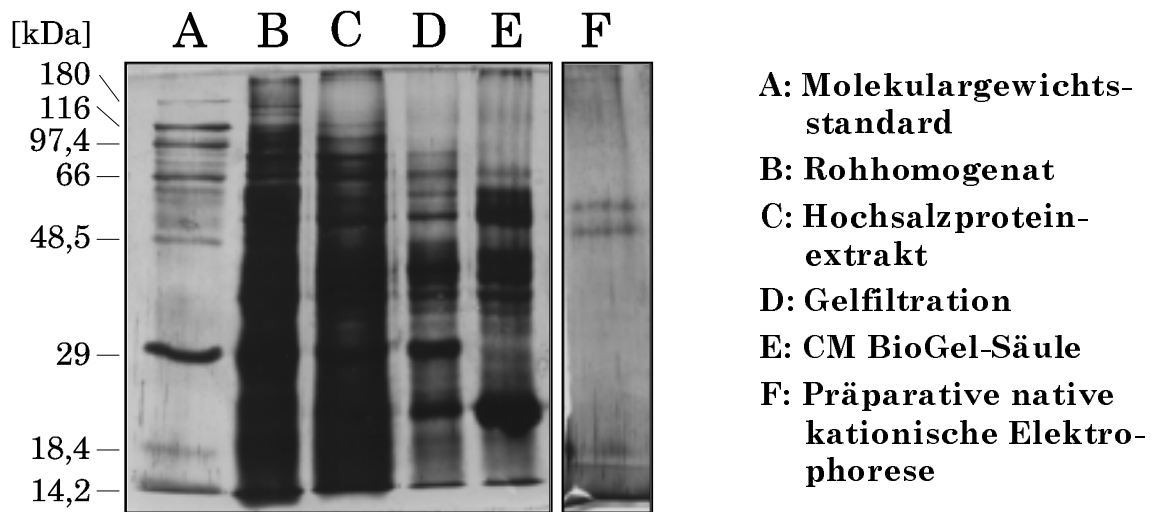
Fraktion	Protein-Menge (mg)	Aktivität (nkat)	Spezifische Aktivität (nkat/mg)	Reinigungs-Faktor
Rohhomogenat	11.067	50*	0,0045	1
Hochsalzextrakt	66,8	47,50	0,71	158
Hochsalzroh-proteinlösung	38,7	20,30	0,52	116
Gelfiltration	11,2	20,80	1,90	422
Kationen-austauscher	0,2	6,33	31,60	7022
Präp. native PAGE	0,021	0,71	33,80	7511

Legende zu Tabelle 7:

Die Aktivität der sequentiellen Diglucosidase wurde über die Spaltung von Amygdalin ermittelt (Kapitel 2.7.2). *Da die Aktivität der sequentiellen Diglucosidase im Rohhomogenat nicht direkt bestimmt werden konnte, wurde dieser Wert aus der Aktivität des Hochsalzextraktes berechnet. Dabei wurde davon ausgegangen, daß unter Niedersalzbedingungen etwa 5 % der Aktivität der sequentiellen Diglucosidase in Lösung zu bringen sind und somit 95 % der Aktivität im Hochsalzextrakt vorliegen (siehe Tabelle 3). Die Proteinbestimmungen erfolgten mit NanoOrange® (Kapitel 2.9.2). Hochsalzextrakt: siehe Kapitel 3.2 Punkt 1. vor der Ammoniumsulfatfällung; Hochsalzrohproteinextrakt: siehe Kapitel 3.2 Punkt 1. nach der Dialyse; Gelfiltration: siehe Kapitel 3.2 Punkt 2.; Kationenaustauscher: siehe Kapitel 3.2 Punkt 4.; Präp. native kationische PAGE: siehe Kapitel 3.2 Punkt 7.

Mit den unterschiedlichen Reinigungsstufen der sequentiellen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* wurde eine diskontinuierliche denaturierende SDS-Elektrophorese (Kapitel 2.5.4) zur Dokumentation durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 18 dargestellt.

Abbildung 18: SDS-Elektrophorese der Fraktionen mit sequentieller Diglucosidase im Verlauf der Proteinreinigung



Legende zu Abbildung 18:

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in Polyacrylamid-Gelen (10 %ig) unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli (1970). In der Abbildung sind zwei Gele dargestellt, die unter identischen Elektrophoresebedingungen entwickelt wurden. Aufgrund der stark unterschiedlichen Proteinmengen auf den jeweiligen Gelen wurden für die Dokumentation die beiden Gele jeweils zwischen den aufgetragenen Spuren E und F zerschnitten. Die Menge der sequentiellen Diglucosidase, die pro Spur aufgetragen wurde, betrug bei den Spuren A bis E 6 pkat und bei der Spur F 10 pkat. Die Detektion erfolgte über eine Silberfärbung (Kapitel 2.5.5).

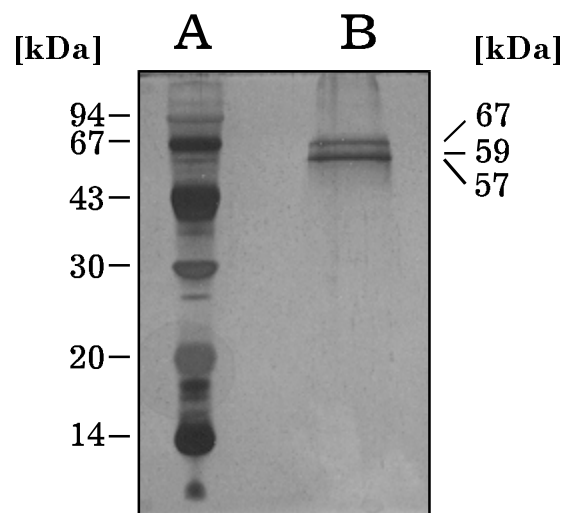
Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die sequentielle Diglucosidase mit den durchgeführten Trennmethode(n) aus Blättern von *Hevea brasiliensis* bis zur Homogenität gereinigt werden konnte. Das Enzym besteht aus drei Untereinheiten. Die Verwendung von zwei unterschiedlichen Gelsystemen zur Trennung und Reinigung der sequentiellen Diglucosidase erbrachten bei den im Anschluß an die nativen Elektrophoresen durchgeführten SDS-PAGE-Analysen nach Silberfärbung jeweils ein identisches Bandenmuster. Da bislang nicht ausgeschlossen werden kann, daß es sich bei den detektierten Proteinbanden um mögliche identische Degradationsprodukte handelt, kann über die Natur der drei nachgewiesenen Untereinheiten (Molekulargewichte: 67, 59 und 57 kDa) noch keine endgültige Aussage gemacht werden.

3.4 Charakterisierung der sequentiellen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis*

1. Bestimmung des Molekulargewichtes der nativen Form

Die Bestimmung des Molekulargewichtes der nativen Form der sequentiellen Diglucosidase erfolgte über eine Superdex 200[®]-Säule (Kapitel 2.3.2). Als Kalibrierproteine wurden folgende Substanzen verwendet: Cytochrome C 12 kDa, Ovalbumin 42 kDa, BSA 69 kDa, Aldolase 158 kDa, Catalase 232 kDa, Ferritin 440 kDa und Thyroglobulin 669 kDa verwendet. Es ergab sich ein Molekulargewicht der nativen Form der sequentiellen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* von 365 kDa. Die Molekulargewichte der Untereinheiten der Diglucosidase wurden über eine denaturierende SDS-PAGE mit 67 (α), 59 (β) und 57 (δ) kDa (Abbildung 19) bestimmt. Dies deutet daraufhin, daß es sich um ein heterotrimeres Protein handelt.

Abbildung 19: SDS-Elektrophorese der sequentiellen Diglucosidase



Legende zu Abbildung 19:

Die Auftrennung der Proteine erfolgte auf einem Polyacrylamid-Gel (12,5 %ig) unter denaturierenden Bedingungen (Kapitel 2.5.4). Die aufgetragene Aktivität der gereinigten sequentiellen Diglucosidase lag bei 15 pkat (Spur B). Die Detektion erfolgte über eine Silberfärbung (Kapitel 2.5.6). Spur A: Molekulargewichtsstandard

2. Nachweis der Glycosilierung der sequentiellen Diglucosidase

Die von Kuroki und Poulton (1986) sowie Fan und Conn (1985) beschriebenen Diglucosidasen sind Glycoproteine. Auch die sequentielle Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* konnte als ein Glycoprotein identifiziert werden. Einen Hinweis hierfür zeigte das Bindungsverhalten des Enzyms (Bindung des Glycoproteinanteil mit Glucose und/oder Mannoseeinheiten) an Säulen des Lectins Concanavalin A. Von dieser Säule ließ sich das Enzym mit α -Methyl-D-Glucosid wieder eluieren. Des weiteren zeigte die sequentielle Diglucosidase eine positive Reaktion bei der Periodsäure-Silberfärbung nach Dubray und Bezard (1982). Diese wurde mit einem SDS-Gel durchgeführt, auf dem eine Proteinfraction aufgetragen wurde, die bis einschließlich der Kationenaustauscherchromatographie (Kapitel 2.3.3) gereinigt worden war.

3. Substratspezifität der sequentiellen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis*

Die Substratspezifität der gereinigten sequentiellen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* wurde durch Inkubationen mit verschiedenen glucosidischen Substraten bestimmt und mit den kinetischen Daten der in der Literatur beschriebenen Enzymen verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Substratspektrum der sequentiellen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis*

Substrat	<i>Hevea brasiliensis</i>		<i>Linum^a Manihot^a Prunus^a</i>		
	Aktivität nkat/mg Protein	(%)	Spaltung (%)		
Cyanogene Diglucoside					
Linustatin	0,28	(100)	100	100	14
Amygdalin	0,48	(171)	65	151	100
Neolinustatin	0,22	(79)	59	69	34
Cyanogene Monoglucoside					
Linamarin	0	(0)	0	0	0
Prunasin	0,09	(32)	7,6	60	0
Dhurrin	Spaltung	(n.b.)	167	n.b.	n.b.
Sambunigrin	Spaltung	(n.b.)	n.b.	n.b.	n.b.
Zucker					
Gentiobiose	0,107	(38)	13	177	0
Cellobiose	0,80	(286)	14	251	0
Saccharose	0,047	(17)	1,4	69	0
Nicht cyanogene Glycoside					
pNP- β -D-glucosid	1,43	(511)	242	414	74
pNP- α -D-glucosid	0	(0)	0	0	0
pNP- β -D-galactosid	0,33	(118)	25	583	9
pNP- α -D-galactosid	0,098	(35)	n.b.	77	n.b.
4-MeU- β -D-glucosid	Spaltung	(n.b.)	+	+	168
4-MeU- β -D-lactosid	keine Spaltung		n.b.	n.b.	n.b.
4-MeU- β -D-cellobiosid	keine Spaltung		n.b.	n.b.	n.b.
4-MeU- β -D-galactosid	keine Spaltung		n.b.	n.b.	n.b.
Coniferin	Spaltung	(n.b.)	n.b.	n.b.	n.b.

Legende zu Tabelle 8:

Die Substratspezifität der sequentiellen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* wurde mit einer gereinigten Enzymfraktion (Kapitel 2.3.3) mit unterschiedlichen Substraten (6 mM) unter Standardinkubationsbedingungen bestimmt (Kapitel 2.7.2). Die Aktivität gegenüber cyanogenen Glucosiden wurde über die Bestimmung der freigesetzten Cyanid- bzw. Glucosekonzentrationen

errechnet. Bei den pNP-Zuckerderivaten wurde die entstandene Konzentration an p-Nitrophenol bei 400 nm photometrisch ermittelt. Die Spaltung der 4-Methylumbelliferyl-derivate erfolgte über das Detektieren der Fluoreszenz bei 366 nm. Bei den in Klammern angegebenen Prozentwerten handelt es sich um relative Aktivitätsangaben, dabei wurde die Aktivität der Spaltung der natürlichen Substrate (Linustatin bei *Hevea*, *Linum* und *Manihot* bzw. Amygdalin bei *Prunus*) gleich 100 % gesetzt. n.b.: nicht bestimmt

^aDie Literaturdaten sind folgenden Arbeiten entnommen: zu *Linum usitatissimum* aus Fan und Conn (1985), zu *Manihot esculenta* aus Warnecke (1995) und zu *Prunus serotina* aus Kuroki und Poulton (1986) (Amygdalin-Hydrolase II).

- *Cyanogene Mono- und Diglucoside*

Die sequentielle Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* spaltet alle angebotenen cyanogenen Diglucoside. Die beiden aliphatischen cyanogenen Diglucoside werden etwa gleich schnell gespalten. Im Vergleich dazu ist die Umsatzrate für das aromatische Glucosid Amygdalin höher. Aus der Spaltung von Amygdalin, welches ein aromatisches Aglykon besitzt, entsteht primär das cyanogene Monoglucosid Prunasin, das von der sequentiellen Diglucosidase sekundär ebenfalls als Substrat akzeptiert wird. Im Gegensatz dazu werden Linamarin und Lotaustralin, die Hydrolyseprodukte der aliphatischen cyanogenen Diglucoside Linustatin und Neolinustatin, nicht von der sequentiellen Diglucosidase hydrolysiert.

Eine vergleichbare Diskriminierung aromatischer Monoglucoside konnte bei der Amygdalin-Hydrolase aus *Prunus serotina* (Kuroki et al., 1986), bei der Linustatinase aus *Linum usitatissimum* (Fan und Conn, 1985) und bei der sequentiellen Diglucosidase aus *Manihot esculenta* (Warnecke, 1995) detektiert werden. Offensichtlich werden grundsätzlich die Hydrolyseprodukte der in den entsprechenden Pflanzen vorkommenden Diglucoside nicht von den jeweiligen Diglucosidasen weiter gespalten. Diese Spaltungscharakteristik bestätigt den Linustatin-Weg (Selmar, 1992). Die sequentiellen Diglucosidasen in cyanogenen Pflanzen sind damit für die Hydrolyse der diglucosidischen Transportmetaboliten unter Bildung der entsprechenden Monoglucoside verantwortlich.

- *Andere Substrate*

Die Disaccharide Cellobiose, Gentiobiose und Saccharose werden von der sequentiellen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* in der genannten Reihenfolge mit abnehmender Aktivität hydrolysiert. Die sequentielle Diglucosidase spaltet auch einige synthetische Substrate, wie z. B. verschiedene Glycoside des p-Nitro-

phenols (pNP). Das pNP- β -D-glucosid wird sogar deutlich effizienter von der sequentiellen Diglucosidase hydrolysiert als die getesteten natürlichen Substrate. pNP- α -D-glucosid wird hingegen nicht hydrolysiert. Ähnlich verhält es sich mit den anderen angebotenen Derivaten des p-NP. Während das pNP- β -D-galactosid hydrolysiert wird, erfolgt eine Umsetzung der α -Form nur langsam. Im Vergleich zu den anderen beschriebenen sequentiellen Diglucosidasen aus *Linum usitatissimum*, *Manihot esculenta* und *Prunus serotina* läßt sich feststellen, daß diese Enzyme als β -spezifisch zu bezeichnen sind.

3.5 Kinetische Daten der sequentiellen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis*

3.5.1 Bestimmung der Michaelis-Konstanten (K_M) und der maximalen Umsatzgeschwindigkeiten (v_{max})

Zur weiteren Charakterisierung der gereinigten sequentiellen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* wurden die kinetischen Eigenschaften des Enzyms (K_M - und v_{max} -Werte) gegenüber den einzelnen cyanogenen Diglucosiden Linustatin, Neolinustatin und Amygdalin und dem artifiziellen Substrat p-NP- β -D-glucosid bestimmt (Kapitel 2.7.2). Als Enzymprobe wurde eine Kationenaustauscherfraktion (Kapitel 2.3.3) mit der Aktivität einer sequentiellen Diglucosidase eingesetzt. Die ermittelten K_M - und v_{max} -Werte sind in Tabelle 9 zusammengefaßt. In Abbildung 20 ist die graphische Auswertungen nach Lineweaver und Burk (1934) sowie Hanes (1932) dargestellt.

Tabelle 9: K_M - und v_{max} -Werte der sequentiellen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* für Linustatin, Neolinustatin, Amygdalin und p-NPG; graphisch ermittelt nach Lineweaver-Burk und Hanes

Substrate	K_M -Wert (mM)		v_{max} (nkat/mg)		v_{max}/K_M	
	Line.-Burk	Hanes	Line.-Burk	Hanes	Line.-Burk	Hanes
Amygdalin	0,73	1,19	4,38	5,98	6,0	5,03
Linustatin	3,20	2,12	7,72	6,04	2,41	2,85
Neolinustatin	0,11	0,11	2,28	2,27	20,73	20,64
p-NPG	0,40	0,37	1	0,94	2,53	2,54

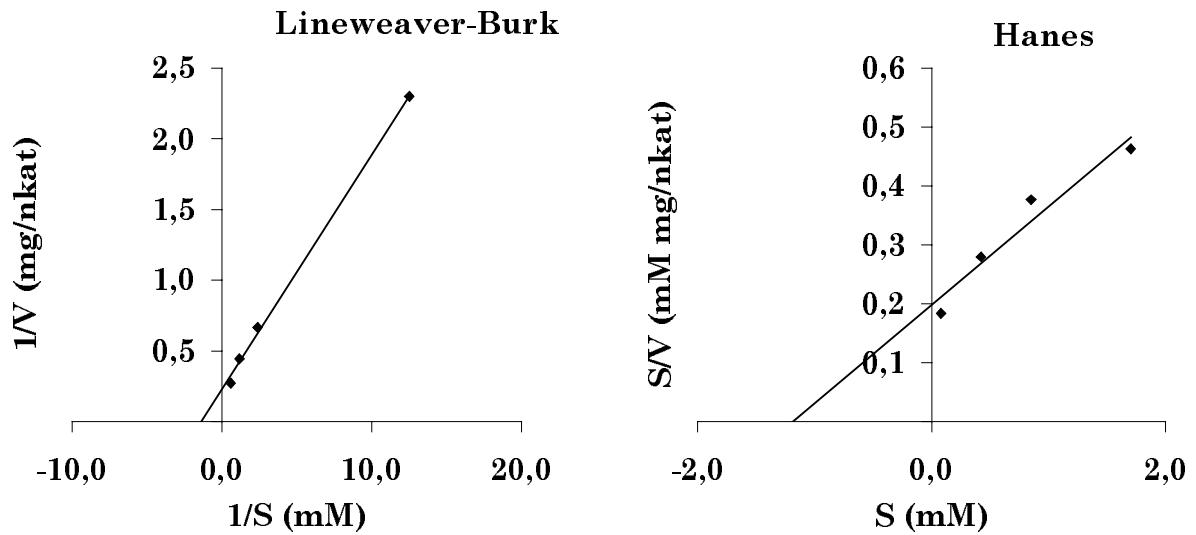
Legende zu Tabelle 9:

Die ermittelten Werte ergaben sich durch die Inkubation unterschiedlicher Substratkonzentrationen cyanogener Glucoside mit einer gereinigten Enzymlösung der sequentiellen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* (bis Kapitel 2.3.3). Die jeweils entstandenen Produkte (Glucose, Cyanid und p-Nitrophenol) wurden photometrisch bestimmt. Die graphischen Auswertungen nach Lineweaver-Burk bzw. Hanes ergaben die dargestellten K_M - und v_{max} -Werte.

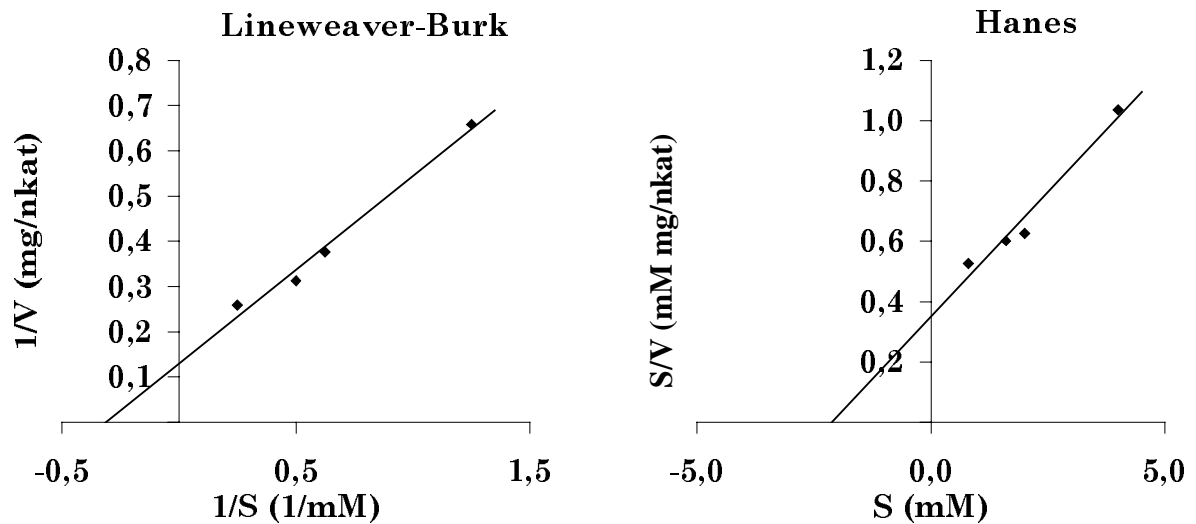
Die ermittelten Werte lassen sich alle in der doppelt reziproken Darstellung nach Lineweaver-Burk bzw. in der Darstellung nach Hanes linearisieren (Abbildung 20).

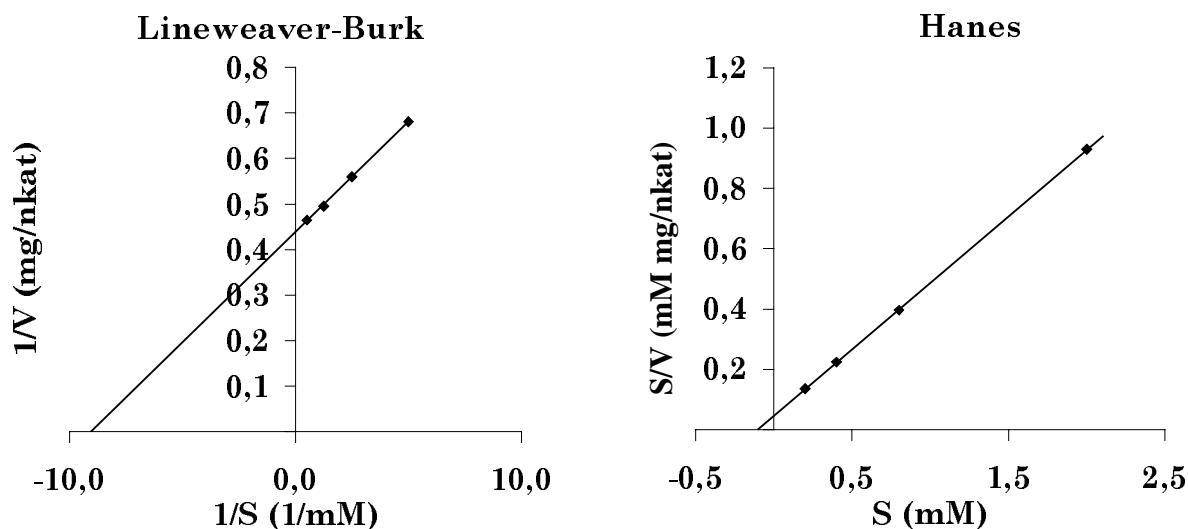
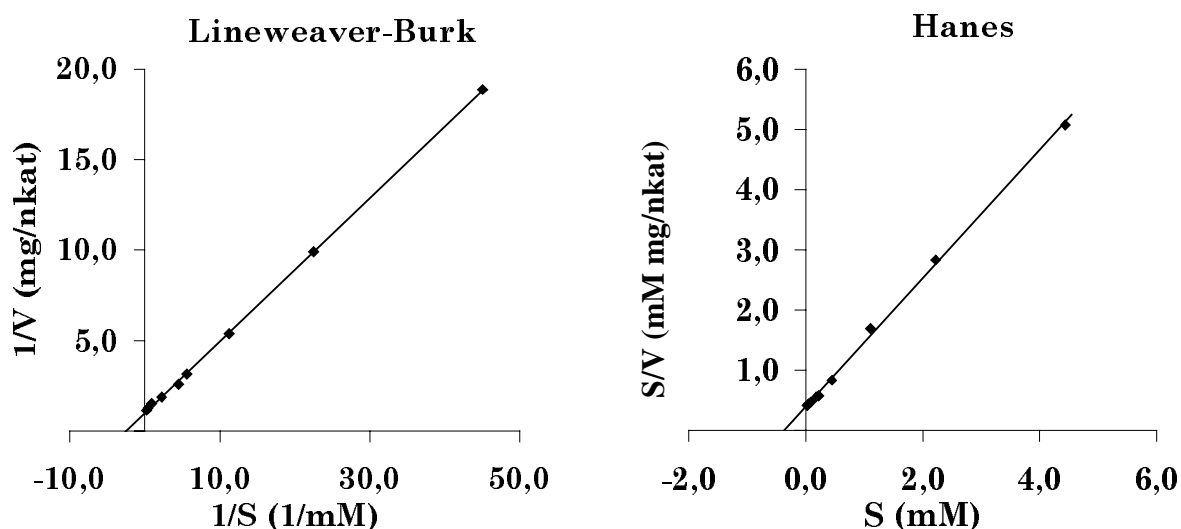
Abbildung 20: Graphische Darstellung der Substratkinetiken nach Lineweaver-Burk und Hanes

Amygdalin (Konzentrationsbereich 0,04 – 1,7 mM):



Linustatin (Konzentrationsbereich 0,4 – 4 mM):



Neolinustatin (Konzentrationsbereich 0,2 – 2 mM):**p-Nitrophenyl- β -D-glucosid (Konzentrationsbereich 0,0222 – 4,44 mM):**

Sowohl bei der doppelt reziproken Auftragung der Substratkonzentrationen gegen die Umsatzrate (nach Lineweaver-Burk) als auch bei der Auftragung nach Hanes ergab sich für die getesteten Substanzen ein linearer Zusammenhang. Somit ist die sequentielle Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* ein Enzym, das der Michaelis-Menten-Kinetik² folgt. Die Betrachtung der K_M -Werte für die cyanogenen Diglucoside liefert folgende ansteigende Reihenfolge: Neolinustatin,

² Der K_M -Wert wird nach der ursprünglichen Definition von Michaelis-Menten verwendet. Dabei gilt für $K_M = k_{-1} + k_2/k_1$, k_2 wird hierbei als vernachlässigbar klein angesehen.

Amygdalin und Linustatin. Für den v_{\max} -Wert ergibt sich genau die umgekehrte Reihenfolge: das aliphatische Glucosid Linustatin wird am schnellsten umgesetzt, gefolgt von Amygdalin und Neolinustatin.

Das künstliche Substrat p-NPG besitzt einen K_M -Wert der etwas höher als der des Neolinustatins ist; es wird aber von den untersuchten Substanzen am langsamsten umgesetzt (Umsatzgeschwindigkeit 7,7 mal kleiner im Vergleich zum Linustatin).

3.5.2 Einfluß von β -Glucosidase-Hemmstoffen

Zur Untersuchung der Hemmbarkeit der sequentiellen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* kamen unterschiedliche in der Literatur bekannte Hemmstoffe für β -Glucosidasen zum Einsatz. Es wurden eine gemäß Kapitel 2.3.3 gereinigte Proteinprobe und die folgenden Hemmstoffe (1 mM im Inkubationsansatz) eingesetzt: Castanospermin, *N*-D-Glucosylpiperidin, *N*-D-Galactosylpiperidin, Nojirimycin und δ -Gluconolacton unter Verwendung von Amygdalin als Substrat (Kapitel 2.10.2). In Tabelle 10 sind die Ergebnisse dieser Hemmstoffversuche dargestellt.

Tabelle 10: Hemmbarkeit der sequentiellen Diglucosidase

Hemmstoff (1 mM)	Relative Aktivität (%)
Kontrolle	100
Castanospermin	9,5
<i>N</i> -D-Glucosylpiperidin	0
<i>N</i> -D-Galactosylpiperidin	77,2
Nojirimycin	6,7
δ -Gluconolacton	6,5

Legende zu Tabelle 10:

Die Hemmstoffe (1mM) wurden mit einer entsprechend Kapitel 2.3.3 gereinigten Enzymfraktion der sequentiellen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* mit Amygdalin im Standardinkubationsansatz (6 mM) inkubiert (Kapitel 2.10.2). Die Berechnung der freigesetzten Glucose- und Cyanidkonzentrationen erfolgte gemäß Kapitel 2.7.2.

Bis auf *N*-D-Galactosylpiperdin hemmen alle untersuchten Hemmstoffe die Aktivität der sequentiellen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* sehr effizient. Ent-

sprechende Daten wurden auch für die anderen Diglucosidasen publiziert: Fan und Conn (1985) konnten zeigen, daß die Aktivität der Linustatinase aus *Linum* durch δ -Gluconolacton kompetitiv gehemmt wurde. Lizotte und Poulton (1986) beobachteten eine nicht kompetitive Hemmung der Amygdalin-Hydrolase aus *Prunus* durch δ -Gluconolacton und Castanospermin.

3.6 Verwendung weiterer chromatographischer Trennmedien für die Reinigung der sequentiellen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis*

Bei der Reinigung der sequentiellen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* wurden zusätzlich noch andere Trennmedien getestet. Die Beschreibung dieser chromatographischen Medien, die zu keinem direkten Reinigungserfolg des Enzyms geführt haben, soll unter anderem dazu dienen, die Eigenschaften des Enzyms näher zu charakterisieren. Dabei wurde für die Gelfiltration mit Sephacryl S-300[®] und die Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) mit Phenylsepharose 6 FF[®] eine Probe verwendet, die nur einer Aufkonzentrierung der Proteine mit Ammoniumsulfat und einer Dialyse unterzogen wurde (Kapitel 2.3.1). Für die anderen genannten Trennmedien wurden Enzymproben benutzt, mit der eine Reinigung bis einschließlich zur Kationenaustauscherchromatographie durchgeführt wurde (Kapitel 2.3.3). Die getesteten Enzymproben hatten eine Aktivität der sequentiellen Diglucosidase von etwa 50 pkat/mL und einen Proteingehalt von ~ 200 μ g/mL. Die Aktivitätsbestimmungen in den einzelnen Fraktionen wurden gemäß Kapitel 2.7.2 durchgeführt.

1. Gelfiltration mit Sephacryl S-300[®]

Die Aktivität der sequentiellen Diglucosidase wurde auf eine Sephacryl S-300[®]-Gelfiltrationssäule (Trennbereich: globuläre Proteine: M_r 10.000 – 1.5 Mill. kD) aufgetragen (Kapitel 2.6.1). Nach Entwicklung der Säule ließ sich die applizierte Proteinmenge (400 μ g) wieder vollständig eluieren; die eluierte Aktivität der sequentiellen Diglucosidase betrug jedoch nur 10 % der aufgetragenen Menge (aufgetragene Aktivität: 100 pkat; eluierte Aktivität: 10 pkat). Das Behandeln der Säule mit einem linearen NaCl-Gradienten bis zu einer Konzentration von

1 M führte zu keiner weiteren Elution von Proteinen mit der vermißten Enzymaktivität.

Sephacryl S-300[®] ist ein hydrophiles Material auf einer Allyldextran-/Bisacrylamidmatrix, wohingegen das erfolgreich zur Reinigung eingesetzte Superdex 200[®]-Material aus sphärisch angeordneten vernetzten Dextranen und Agaroseanteile besteht. Möglicherweise hat das Material der Sephacryl S-300[®]-Säule zu einer Abtrennung oder Interaktion von Substanzen geführt, die für die Stabilität der Enzymaktivität verantwortlich sind. Um dies zu überprüfen, wurde die eluierte Proteinmenge mit Konzentratoren eingengt und gemäß Kapitel 2.10 auf die Wirkung von Effektoren untersucht. Es ließ sich jedoch auch durch diese Zusätze keine Aktivität einer sequentiellen Diglucosidase nachweisen.

2. *Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) mit Phenylsepharose 6 FF[®]*

Die Trenneigenschaften der HIC basieren auf Wechselwirkungen zwischen dem Säulenmaterial und der Oberflächenhydrophobizität der applizierten Proteine. Das verwendete Material (Phenylsepharose 6 FF[®]) besteht aus sphärisch angeordneten, unterschiedlich vernetzten Agarosemolekülen, die über chemisch stabile Ethergruppen mit Phenylresten derivatisiert sind. Die Bindung applizierter Proteine wird durch eine hohe Ionenstärke während der Applikation der Probe auf das Säulenmaterial erreicht. HIC-Säulen sind damit prädestiniert für den Einsatz als Reinigungsschritt im Anschluß an eine Ammoniumsulfatfällung. Dementsprechend wurden auf eine Phenylsepharose 6 FF[®]-Säule (Kapitel 2.6.2) die folgenden Enzymproben appliziert: 1.) ein *Hevea*-Hochsalzproteinextrakt, der einer Ammoniumsulfatfällung unterzogen wurde (Kapitel 2.3.1) und 2.) eine über Kationenaustauscher gereinigte Enzymprobe (Kapitel 2.3.3), die mit 1,2 M Natriumchlorid versetzt worden war. Die Aktivität der sequentiellen Diglucosidase wurde unter den verwendeten chromatographischen Bedingungen jedoch nicht an das Säulenmaterial gebunden. Dies läßt vermuten, daß die sequentielle Diglucosidase keine hydrophoben Gruppen an der Oberfläche des Moleküls exponiert hat.

3. *Hydroxyapatit*

Das verwendete keramische Hydroxyapatitmaterial besteht aus einer sphärischen Form mit Makroporen. Die Bindung von Proteinen an dieses Material beruht sowohl auf dessen Ionenaustauschereigenschaften als auch auf Wechselwirkungen, die der Affinitätschromatographie ähnlich sind (Gorbunoff, 1984). Der genaue Bindungsmechanismus der Proteine ist noch nicht geklärt. Um eine erfolgreiche Adsorption der Probe an das Säulenmaterial zu gewährleisten, müssen die verwendeten pH-Werte (7,2 bzw. 6,8) eingehalten werden. (Kapitel 2.6.3). Die sequentielle Diglucosidase wurde aber unter den gewählten chromatographischen Bedingungen nicht an das Säulenmaterial gebunden, da die Wechselwirkungen nicht ausreichend waren.

4. *Affinitätschromatographie mit Concanavalin A-Sepharose 4B[®]*

Die Bindung eines Enzyms an eine Con A-Säule erfolgt, wenn das Protein Zuckerreste besitzt, die Glucose- und/oder Mannosemoleküle beinhalten. Wurde die sequentielle Diglucosidase (Reinigung bis Kapitel 2.3.3) auf eine Concanavalin A-Sepharose 4B[®]-Säule aufgetragen, so wurde das Enzym an dieses Säulenmaterial gebunden. Mit diesem Sachverhalt kann zusätzlich der Glycoproteincharakter dieses Enzyms belegt werden (siehe Kapitel 3.4, Punkt 2.). Das Fließmittel der Con A-Säulenchromatographie enthält zur Aufrechterhaltung der Ligandenstabilität des Materials die Ionen Mn^{2+} und Co^{2+} . Diese Ionen haben aber bei den Versuchen zur Effektorenwirkung gezeigt (Kapitel 3.1.10), daß sie einen gegensätzlichen Effekt auf die Aktivität der sequentiellen Diglucosidase haben. So verdoppeln Mn^{2+} -Ionen die Aktivität, Co^{2+} -Zusatz hingegen vermindert sie um 40 % (Effektorenkonzentration: 5 mM). Bei der Inkubation einer Enzymlösung mit dem verwendeten Con A-Säulenfließmittel (Konzentration der Ionen Co^{2+} und Mn^{2+} : 1 mM) kam es ebenfalls zu einer Erhöhung der Enzymaktivität um 135 %. Um diesen Aktivierungseffekt beim Einsatz des Con A-Fließmittels für die Reinigung der sequentiellen Diglucosidase bei der Bilanzierung der Aktivitäten im Verlaufe des Reinigungsschemas zu berücksichtigen, müßten die Ionen auch in den anderen verwendeten Lösungen zugesetzt werden. Damit ergeben sich z. B. bei der Gelfiltration Probleme mit der Bilanzierung der Aktivitäten, da die zugesetzten Ionen während der Chromatographie wieder ab-

getrennt würden. Außerdem wurde bei der mehrfachen Applikation verschiedener Proteinlösungen, die die Aktivität einer sequentiellen Diglucosidase enthielten, auf eine Con A-Säule eine Abnahme des gebundenen Anteils des Enzyms beobachtet (Tabelle 11).

Tabelle 11: Abnahme der Bindungsfähigkeit der Con A-Säule nach mehrfacher Applikation von Diglucosidase-Enzymlösungen

Anzahl der Säulenläufe	Gebundene Aktivität der sequentiellen Diglucosidase an eine Con A-Säule (%)
1.	100
2.	76
3.	47
4.	31

Legende zu Tabelle 11:

Auf eine gemäß Kapitel 2.6.4 jeweils konditionierte Con A-Säule wurden mehrmals hintereinander Enzymlösungen aus *Hevea*-Blättern aufgetragen, die bis einschließlich der Kationenaustauscherchromatographie (Kapitel 2.3.3) gereinigt und auf den Puffer der Con A-Chromatographie eingestellt waren. Anschließend wurde die Aktivität der sequentiellen Diglucosidase (Kapitel 2.7.2) in den Fraktionen bestimmt, die an die Säule gebunden bzw. nicht gebunden hatten. Die jeweils errechneten Aktivitäten der sequentiellen Diglucosidase wurden jeweils verglichen mit der Gesamtaktivität (= 100 %), die insgesamt auf die Con A-Säule aufgetragen wurde.

Die Bindungsstellen für die sequentielle Diglucosidase wurden bei dem verwendeten Säulenmaterial (Kapitel 2.6.4) durch das mehrmalige Auftragen von Enzymlösungen irreversibel belegt. Damit kann das Con A-Säulenmaterial aufgrund der mangelnden Regenerationsfähigkeit nicht für die Enzymreinigung eingesetzt werden.

5. Anionenaustauscherchromatographie mit Q Sepharose HP® und DEAE-Sephacel®

Bei der Reinigung der sequentiellen Diglucosidase wurde erfolgreich ein Kationenaustauscher eingesetzt. Eine weitere Möglichkeit die ionischen Eigenschaften dieses Enzyms zu nutzen, wäre eine Anionenaustauscherchromatographie. Bei diesem Verfahren binden alle Proteine, die unter den gewählten pH-Bedingungen negative Ladungen (Überschreitung des isoelektrischen Punktes) tragen, an die eingesetzten Säulenmaterialien. Die durchgeführten Versuche zur Bindung der sequentiellen Diglucosidase an einen starken (Q Sepharose HP®) und einen

schwachen (DEAE-Sephacel®) Anionenaustauscher wurden bei pH-Werten von 7,0 durchgeführt (Kapitel 2.6.5 und 2.6.6). Bei diesen pH-Werten kommt es zu keiner Bindung des Enzyms an die Säulenmaterialien. Eine Wiederholung der Versuche bei einem pH-Wert von 8,0 führte bei beiden eingesetzten Anionenaustauschern nur zu einer teilweisen Bindung des Enzyms, d. h. die Aktivität ließ sich sowohl im Ausschlußvolumen der Säulen als auch durch Elution mit einem NaCl-Gradienten nachweisen. Dieses Bindungsverhalten des Enzyms kann damit begründet werden, daß bei einem pH-Wert von 8,0 noch nicht alle Moleküle in einer negativ geladenen Form vorliegen. Um den isoelektrischen Punkt (pI) des Enzyms zu überschreiten, wäre es somit nötig, den pH-Wert des Fließmittels noch weiter in den basischen Bereich zu verschieben. Zu diesem Zweck wurden Enzymlösungen der gereinigten sequentiellen Diglucosidase (Kapitel 2.3.3) auf McIlvaine-Puffer der pH-Werte 8,0 und 8,5 umgepuffert und inkubiert. Nach einer Einstellung des pH-Wertes auf 5,6 erfolgte die Inkubation im Standardinkubationsansatz (Kapitel 2.7.2) (Tabelle 12).

Tabelle 12: Abnahme der Stabilität der sequentiellen Diglucosidase bei den pH-Werten 8,0 und 8,5

pH-Wert des McIlvaine-Puffers bei der Vorinkubation	Relative Aktivität der sequentiellen Diglucosidase (%)			
	Dauer der Vorinkubation:			
	60 min	120 min	180 min	240 min
5,6	100	100	100	100
8,0	5,3	4,8	3,7	3,2
8,5	2,5	2,1	1,6	1,1

Legende zu Tabelle 12:

Eine gemäß Kapitel 2.3.3 gereinigte Enzymfraktion der sequentiellen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* wurde auf die angegebenen pH-Werte eines McIlvaine-Puffers umgepuffert, bei den jeweiligen pH-Werten (pH: 5,6; 8,0 und 8,5) und den angegebenen Inkubationszeiten (60, 120, 180 und 240 min) vorinkubiert. Nach einer Umpufferung auf den pH-Wert von 5,6 wurde die Aktivität der sequentiellen Diglucosidase mit dem Standardinkubationsansatz mit Amygdalin als Substrat (Kapitel 2.7.2.1) bestimmt. Die errechneten Aktivitäten der sequentiellen Diglucosidase der einzelnen Inkubationen bei pH 5,6 wurden als 100 %-Werte angesehen. Die ermittelten Aktivitätswerte bei den pH-Werten 8,0 und 8,5 wurden entsprechend auf diesen Wert bezogen.

Die Ergebnisse zeigen, daß die sequentielle Diglucosidase bei basischen pH-Werten nicht stabil ist. Damit mußte auf den Einsatz der Anionenaustauscherchromatographie zur Reinigung verzichtet werden.

3.7 Partielle Reinigung der simultanen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis*

Die simultane Diglucosidase ist ein Enzym, von dem Selmar (1986) annahm, daß es als einzige Diglucosidase in *Hevea brasiliensis* vorkommt. Der Aktivitätsnachweis erfolgte dabei durch die Inkubation des cyanogenen Diglucosids Linustatin mit einer von niedermolekularen Substanzen freien *Hevea*-Blattproteinlösung (entspricht dem Niedersalzproteinextrakt dieser Arbeit). Diese Enzymlösung wurde zuvor über eine Gelfiltration mit Sephadex G-150® gereinigt. In den durchgeführten DC-Analysen der Abbaureaktionen der cyanogenen Diglucoside Linustatin und Amygdalin durch die simultane Diglucosidase lassen sich Gentiobiose und geringe Reste von Glucose nachweisen (Selmar, 1986). Aus der heutigen Sicht der Zusammenhänge bezüglich der in *Hevea brasiliensis* vorkommenden Diglucosidasen lassen sich die damaligen Ergebnisse bestätigen. Im Niedersalzextrakt einer Aufarbeitung aus *Hevea*-Blättern läßt sich mit der in dieser Arbeit entwickelten HPLC-Methode (Kapitel 2.8) sowohl eine simultane als auch die Restaktivität einer sequentiellen Diglucosidase durch die Produkte der enzymatischen Abbaureaktionen (Linamarin, Glucose, Gentiobiose) nachweisen (Kapitel 3.1.7).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, neben der Reinigung der sequentiellen Diglucosidase, auch die simultane Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* aufzureinigen. Wie im folgenden ausgeführt, konnte dieses Vorhaben aufgrund von Schwierigkeiten nicht durchgeführt werden. Der Hauptgrund dafür liegt in einer schwer reproduzierbaren Extraktion aktiver simultaner Diglucosidase aus *Hevea*-Blättern. Im folgenden Abschnitt wird kurz dargestellt, welche Maßnahmen unternommen wurden, um die Aktivität einer simultanen Diglucosidase in *Hevea brasiliensis* zu untersuchen und ersten chromatographischen Reinigungsschritten zu unterziehen.

1. Simultane Diglucosidase in *Hevea brasiliensis*

Erfolgten mehrere Aufarbeitungen von jungen, wachsenden *Hevea*-Blättern (Kapitel 2.2.1.1), so ließ sich in 30 % der erhaltenden Niedersalzproteinextrakten die Aktivität einer simultanen Diglucosidase nachweisen. In Tabelle 13 sind exemplarisch mehrere Aufarbeitungen und die in diesen von niedermolekularen Stoffen befreiten Proteinextrakten bestimmbare Aktivität der simultanen Diglucosidase dargestellt.

Tabelle 13: Aktivitäten der simultanen Diglucosidase in Niedersalzextrakten aus *Hevea*-Blättern

Aufarbeitung (Nr.)	Aktivität (pkat/g FG)	Aufarbeitung (Nr.)	Aktivität (pkat/g FG)
1	0	11	27,8
2	24,4	12	0
3	18,6	13	7,2
4	0	14	0
5	0	15	0
6	15,2	16	5,7
7	1,5	17	0
8	< 1	18	0
9	0	19	0
10	0	20	0

Legende zu Tabelle 13:

Die Niedersalzextrakte wurden gemäß Kapitel 2.2.1.1 aus jungen *Hevea*-Blättern hergestellt. Die Bestimmung der Aktivität der simultanen Diglucosidase in den durch PD 10-Säulen von niedermolekularen Stoffen befreiten Proteinextrakten erfolgte gemäß Kapitel 2.7.1 mit Amygdalin (6 mM) als Substrat.

Die Daten zeigen, daß die Aktivität der simultanen Diglucosidase in den unterschiedlichen Proteinextrakten sehr niedrig war und nicht reproduzierbar in allen Aufarbeitungen nachgewiesen werden konnte.

Die hohen Schwankungen der Enzymaktivität der simultanen Diglucosidase können prinzipiell mehrere Ursachen haben:

- (a) die Diglucosidase ist nur partiell löslich und liegt im Sediment der 30.000 x g Zentrifugation der Enzymaufarbeitung vor,
- (b) die Diglucosidase ist zum Teil an Zellwandmaterial assoziiert,
- (c) die Aktivität der Diglucosidase wird im Zuge der Enzymaufarbeitung (unterschiedlich stark) inaktiviert,
- (d) die Diglucosidase unterliegt einer stark schwankenden Expression.

Zu (a): In den wenigen Fällen, in denen sich eine simultane Diglucosidase im Sediment der 30.000 x g Zentrifugation nachweisen ließ, wurde sowohl der Einsatz nicht ionischer Tenside (Triton X-100) als auch die Verwendung hoher Salzkonzentrationen auf den Einfluß der nachweisbaren Aktivität des Enzyms hin untersucht. In den entsprechenden Versuchsansätzen ließ sich keine Erhöhung der Aktivität der simultanen Diglucosidase nachweisen. Damit gibt es keine Befunde für eine mangelnde Löslichkeit des Enzyms.

Zu (b): Um zu untersuchen, ob die simultane Diglucosidase aufgrund einer hohen Affinität zu Zellwandbestandteilen einer Enzympräparation gemäß Kapitel 2.2.1.1 nur unzureichend extrahierbar ist, wurden sowohl die Rohhomogenate als auch die Filtrationsrückstände der Homogenisationen (Zellwandtrümmer) mit verschiedenen Extraktionspuffern (pH 4 – 8) und unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen (100 – 1500 mM) behandelt. Dabei zeigte sich, daß – im Gegensatz zur sequentiellen Diglucosidase – im Falle der simultanen Diglucosidase eine Adsorption an Zellwandtrümmern auszuschließen ist, da keine Aktivitätserhöhung beobachtet werden konnte.

Zu (c): Zur Erfassung und Untersuchung möglicher Inaktivierungen der simultanen Diglucosidase wurden folgende Schutzmaßnahmen getestet.

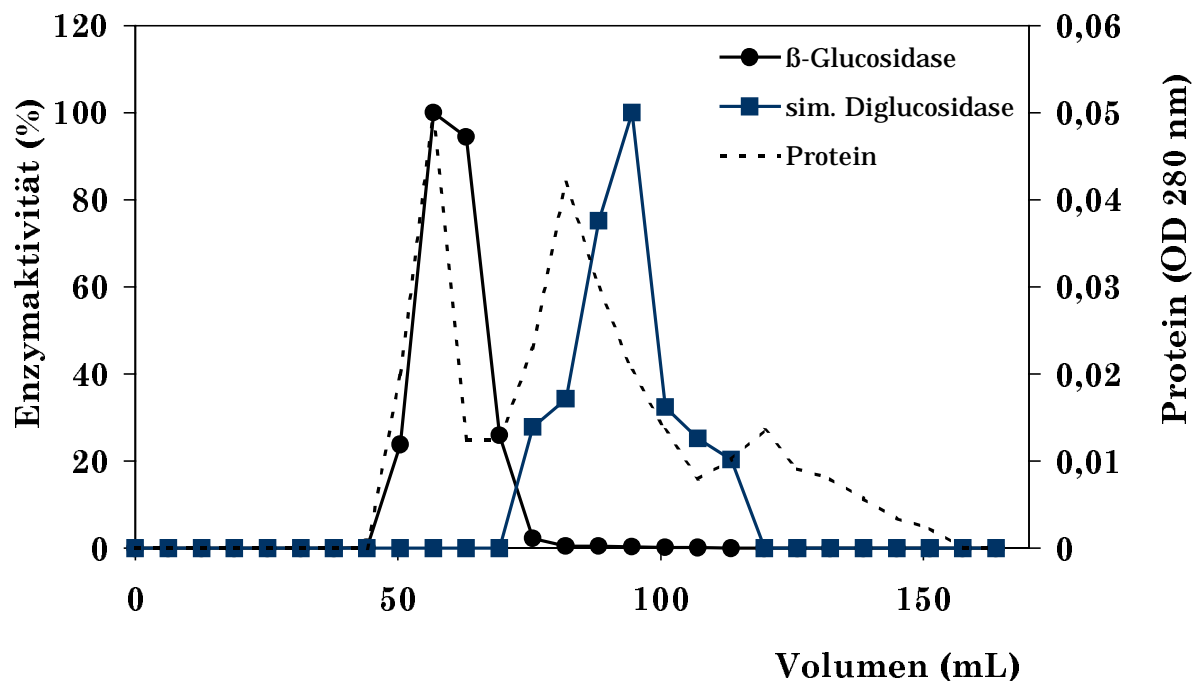
- Einsatz verschiedener Protease-Inhibitoren (Pepstatin A, PMSF und IE; je 0,5 M) und Schutzproteine (BSA; 0,2 %ig)
- Verwendung reduzierender Substanzen (Ascorbinsäure, DTT, DTE)
- Zusatz von PVPP (siehe Kapitel 2.2.3).

Diese Maßnahmen führten ebenfalls zu keiner Erhöhung der extrahierbaren Diglucosidase-Aktivität bzw. konnten die Aktivitätsschwankungen nicht beseitigen. Auch das Aufreinigungsverfahren, welches für die Extraktion der simultanen Diglucosidase aus *Davallia bullata* (Kapitel 2.2.3) optimiert wurde, zeigte keinen Einfluß auf die nachweisbare Aktivität.

Zu (d): Aus den bisher durchgeführten Versuchen kann gefolgert werden, daß die starken Schwankungen der nachweisbaren Enzymaktivität nicht auf experimentelle Faktoren (Schwankungen in der Extrahierbarkeit oder Inaktivierung des Enzyms) zurückzuführen sind, sondern durch eine stark schwankende Expression der simultanen Diglucosidase im Blattgewebe hervorgerufen werden.

Zur Erfassung der Faktoren, die die Expression der simultanen Diglucosidase beeinflussen könnten, wurden *Hevea*-Pflanzen unter verschiedenen Bedingungen kultiviert: unterschiedliche Lichtbedingungen (250 bzw. 50 $\mu\text{E}/\text{m}^2 \times \text{s}$ in Wuchshöhe), hohe bzw. niedrige Temperaturen (30, 25 bzw. 20 °C) und starke bzw. geringe Stickstoffdüngerapplikationen. Keiner der getesteten Faktoren zeigte einen signifikanten Einfluß auf die Schwankungsbreite der meßbaren Aktivität der simultanen Diglucosidase.

Die Niedersalzextrakte (Kapitel 2.2.1.1), die eine ausreichende Aktivität der simultanen Diglucosidase enthielten, wurden nach einer Ammoniumsulfatfällung mit anschließender Dialyse einer Gelfiltration über eine Superdex 200[®]-Säule unterzogen (analog Kapitel 2.3.2). In Abbildung 21 ist das Elutionsprofil der Gelfiltration dargestellt.

Abbildung 21: Elutionsprofil der Superdex 200[®]-Säule

Legende zu Abbildung 21:

Die Niedersalz-Rohproteinlösung wurde über eine Superdex 200[®]-Säule (Fa. Pharmacia) aufgetrennt. Fließmittel: McIlvaine-Puffer; 15 mM; pH 5,6; 100 mM NaCl. Die Aktivität der simultanen Diglucosidase wurde über die Spaltung des cyanogenen Diglucosids Amygdalin ermittelt (Kapitel 2.7.1). Die β -Glucosidase-Aktivität wurde über die Spaltung von p-Nitrophenyl- β -D-glucosid (Kapitel 2.7.2.4) bestimmt. Das Fraktionsvolumen betrug je 4 mL. Enzymaktivitäten: β -Glucosidase: 100 % = 182 nkat/mL; simultane Diglucosidase: 2 pkat/mL.

Nach dem Einengen der aktiven Fraktionen der Gelfiltration mit Hilfe von Konzentratoren (Centriprep 30[®], Fa. Amicon) und der Lagerung im Kühlschrank bei 4 °C für 12 Stunden ließ sich keine Aktivität der simultanen Diglucosidase mehr nachweisen.

Das Problem der Nichtreproduzierbarkeit der Extraktion einer aktiven simultanen Diglucosidase aus Blättern von *Hevea brasiliensis* konnten nicht gelöst werden. Auf die Reinigung dieses Enzyms aus *Hevea brasiliensis* wurde somit verzichtet.

3.8 Untersuchungen zur Aktivitätsverteilung der sequentiellen und der simultanen Diglucosidase in *Hevea*-Sämlingen während der Keimung

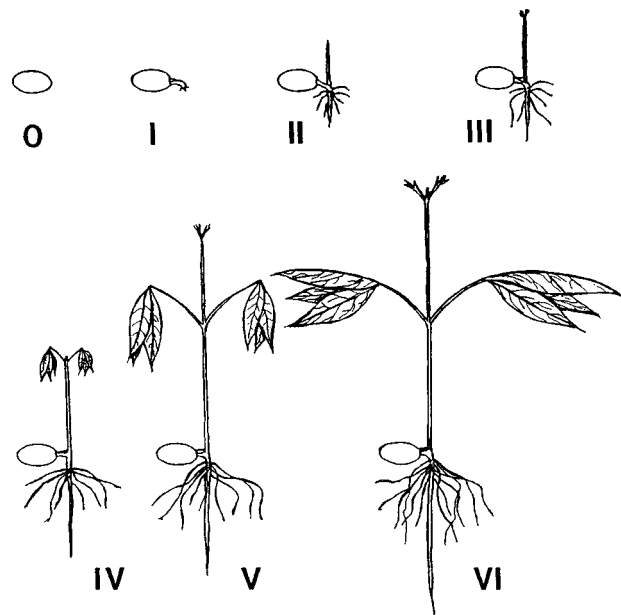
Es wurden die Enzymaktivitäten der simultanen und der sequentiellen Diglucosidase in unterschiedlichen Organen von keimenden *Hevea*-Samen untersucht.

Aus den Arbeiten von Lieberei et al. (1985) und Selmar (1986) ist bekannt, daß der Gehalt an cyanogenen Glucosiden in den Sämlingen des Wildtyps von *Hevea brasiliensis* während der Sämlingsentwicklung stark abnimmt. In anderen Varietäten konnte Selmar (1992) zeigen, daß der Gehalt der als HCN-Potential bestimmten cyanogenen Glycoside während der Keimung auch stark zunehmen kann, um dann in der jungen Pflanze den gesamten ursprünglichen Wert wieder zu erreichen. Lieberei (1984) und Selmar (1992) konnten außerdem zeigen, daß während der Sämlingsentwicklung keine Blausäure bzw. weit weniger als 1 % des HCN-Potentials eines Samens an die Umgebung abgegeben wird. Eine Abnahme des HCN-Potentials ist somit nur durch eine Metabolisierung cyanogener Glucoside zu nicht cyanogenen Verbindungen möglich. Ein Anstieg des HCN-Potentials in den einzelnen Geweben, bilanzierend über alle Gewebe berechnet, kann nur durch eine Neusynthese cyanogener Verbindungen begründet werden. Der genaue zeitliche Ablauf der physiologischen Vorgänge in keimenden *Hevea*-Samen in bezug auf die Neusynthese bzw. den Abbau cyanogener Substanzen ist für den "äußeren Betrachter" schwer zu klären.

Für den Keimungsverlauf von *Hevea*-Samen sind die folgenden samenmorphologischen Grundlagen bekannt: das cyanogene Monoglucosid Linamarin befindet sich zum Beginn der Keimung nur im Endosperm des Samens. Während der Keimung kann ein Nachweis dieser Substanz jedoch auch in anderen Geweben (z. B. in sich entwickelnden Blättern) geführt werden. Da die Gewebe des Endosperms und die der Kotyledonen genetisch voneinander verschieden und nicht durch Plasmodesmen miteinander verbunden sind, kann kein symplastischer Transport der cyanogenen Glycoside erfolgen. Es muß folglich postuliert werden, daß nur eine apoplastische Verlagerung dieser Stoffe möglich ist. Dies wiederum ist für das Monoglucosid Linamarin nicht denkbar, da Gruhnert et al.

(1994) zeigen konnten, daß die einzige β -Glucosidase (Linamarase) in *Hevea brasiliensis* apoplastisch lokalisiert ist. Somit kann ein apoplastischer Transport nur mit der vor der Hydrolyse durch die Linamarase geschützten Transportform (cyanogenes Diglucosid Linustatin) erfolgen (Selmar, 1986). Für die Hydrolyse dieses Metaboliten bestehen nach dem Transport zwei Möglichkeiten: erstens die Abspaltung der terminalen Glucose des Linustatins unter Zurückbildung des Monoglucosids Linamarin oder zweitens die vollständige Hydrolyse der Verbindung unter Freisetzung von Gentiobiose.

Ein geeigneter Weg zur näheren Untersuchung dieser Metabolisierungs- und Verlagerungsvorgänge cyanogener Glycoside in *Hevea*-Keimlingen besteht im Nachweis der Aktivitäten der sequentiellen und/oder der simultanen Diglucosidase in den einzelnen Gewebe der sich entwickelnden Samen. Dazu wurden Samen von *Hevea brasiliensis* gemäß Kapitel 2.1.1.3 und 2.1.1.4 aufgezogen. In Abbildung 22 sind die einzelnen Samenentwicklungsstadien (Selmar, 1992) aufgeführt, die für die anschließende Präparation der Gewebe eingesetzt wurden.

Abbildung 22: Sämlingsstadien von *Hevea brasiliensis***Legende zu Abbildung 22:**

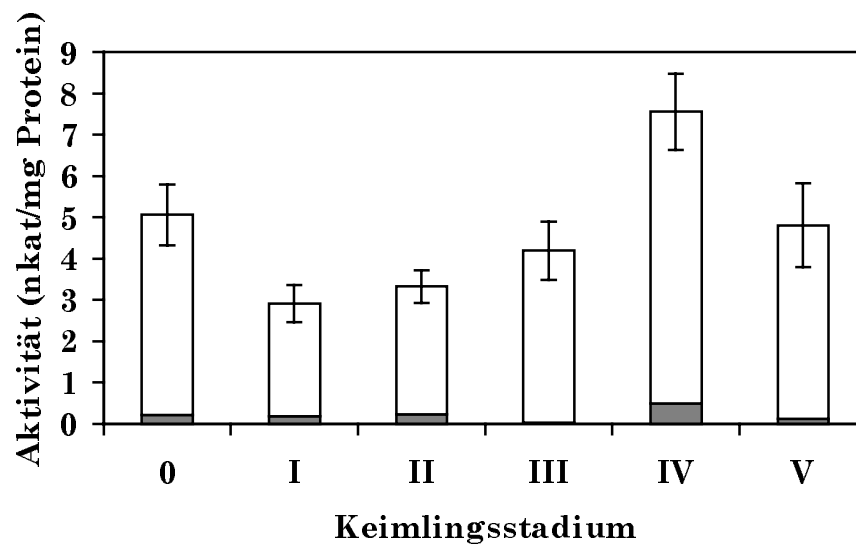
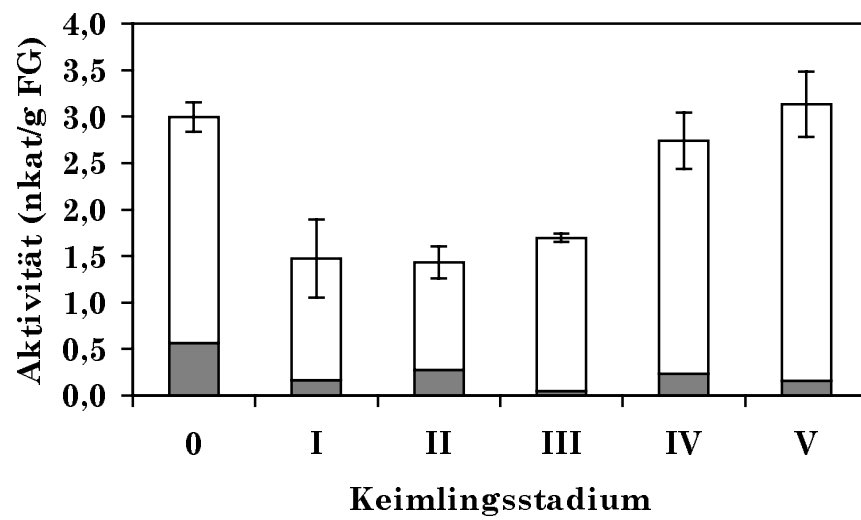
Sämlingsstadium 0 entspricht ungekeimten (nicht gelagerten) Samen von *Hevea brasiliensis* (0 Tage). Bei Stadium I hat die Keimung begonnen, Hypocotyl und Wurzel sind sichtbar (nach 3 Tagen). Bei Stadium II haben sich bereits Sekundärwurzeln gebildet, und der Sproß ist etwa ein bis drei Zentimeter lang (nach 7 Tagen). Bei Stadium III ist der Sproß voll aufgerichtet, und die Primärblätter haben sich entwickelt (entsprechend des Blattstadiums A) (nach 10 Tagen). Bei Stadium IV beginnen sich die Blätter des Sämlings zu entfalten, die Blattfarbe ist rötlich bis braun-grün (entsprechend des Blattstadiums B) (nach 14 Tagen). Bei Stadium V ist das Längenwachstum der Primärblätter abgeschlossen, sie hängen schlaff nach unten, sind weich und hellgrün (entsprechend des Blattstadiums C) (nach 19 Tagen). Im Stadium VI sind die Primärblätter voll entwickelt, ausgehärtet und dunkelgrün (entsprechend des Blattstadiums D) (nach 30 Tagen).

Die Samen und Keimlinge unterschiedlicher Entwicklungsstadien wurden geerntet und in die einzelnen Organe (Endosperm, Kotyledonen, Wurzel, Sproß, Blätter) zerlegt. In den daraus hergestellten Nieder- und Hochsalzproteinlösungen (Kapitel 2.2.2) der unterschiedlichen Organe ließ sich nach der Durchführung der Enzyminkubationen mit dem cyanogenen Diglucosid Amygdalin sowohl eine Cyanid- als auch eine Glucosefreisetzung (Kapitel 2.7.2) im Verhältnis 2:1 nachweisen. Dieses konstante Verhältnis der Reaktionsprodukte der enzymatischen Umsetzung läßt sich nur durch das Vorkommen einer sequentiellen Diglucosidase in den Extrakten begründen. Bei den Inkubationen der entsprechenden Niedersalzextrakte mit dem Diglucosid Amygdalin und der anschließenden Durchführung einer Benzoylierung gemäß der Methode des Kapitels 2.8.1, ließ

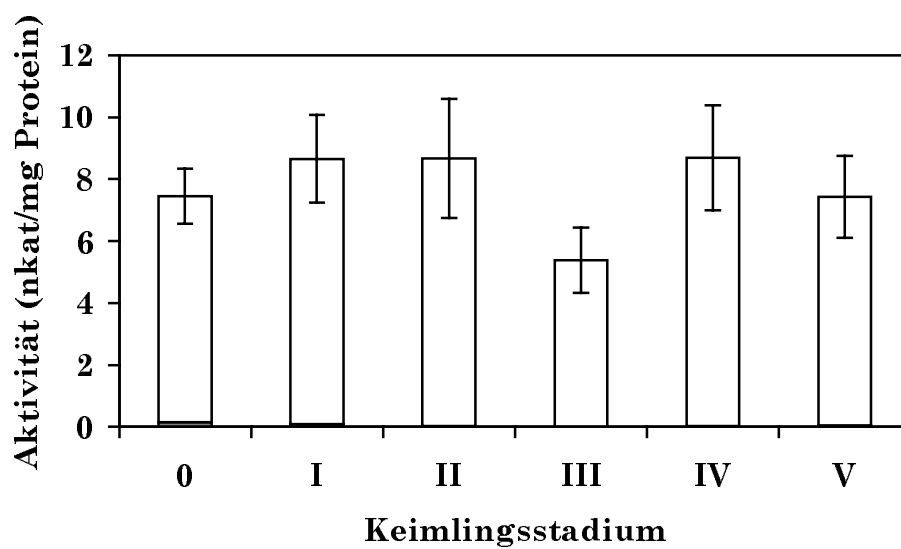
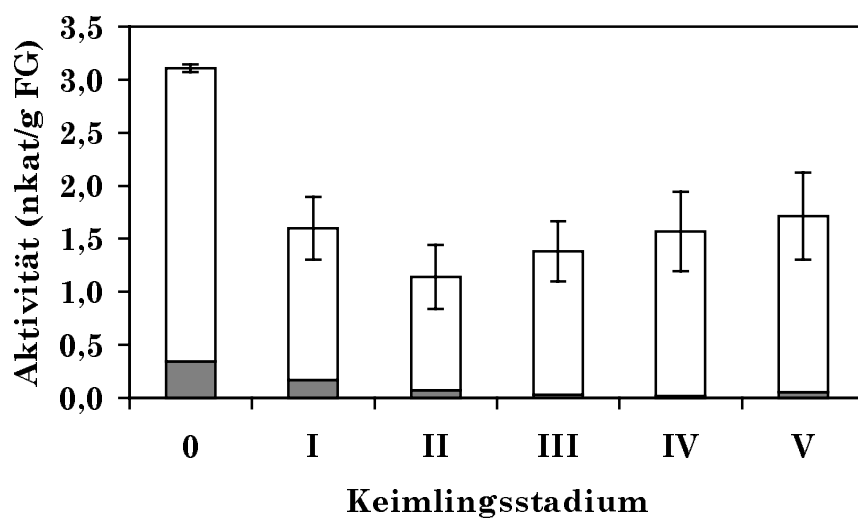
sich bei der HPLC-Analytik keine Gentiobiose-Freisetzung nachweisen. Damit ließ sich in den Proteinextrakten aus den unterschiedlichen Organe der untersuchten *Hevea*-Sämlinge nur eine sequentielle Diglucosidase nachweisen.

In den Abbildung 23 bis 27 sind die bestimmten Aktivitäten der sequentiellen Diglucosidase der verschiedenen Organe dargestellt. In den Proteinextrakten einiger Gewebe ließ sich die sequentielle Diglucosidase sowohl in den Niedersalz- als auch in den Hochsalzextrakten nachweisen (dargestellt durch die unterteilten Balken in den Abbildung 23 – 25).

Abbildung 23: Aktivität einer sequentiellen Diglucosidase in unterschiedlichen Entwicklungsphasen des Endosperms



ildung 24 ti it teine se uentiellen iglu sidase in
unte s iedli en nt i lungs asende K t led nen



ildung 25 ti it teine se uentiellen iglu sidase in
unte s iedli en nt i lungs asen des sses

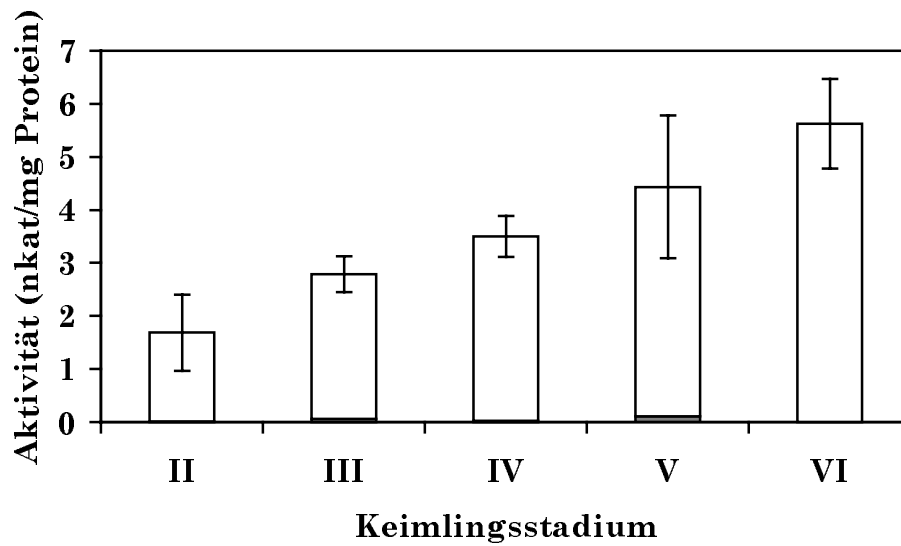
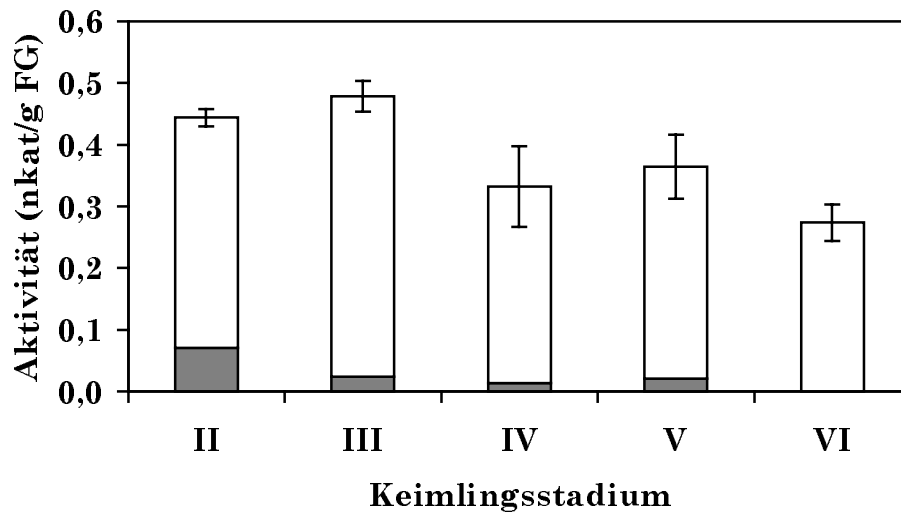


Abbildung 26: Aktivität der Harnstoffzyklase in
unterschiedlichen Keimlingsstadien

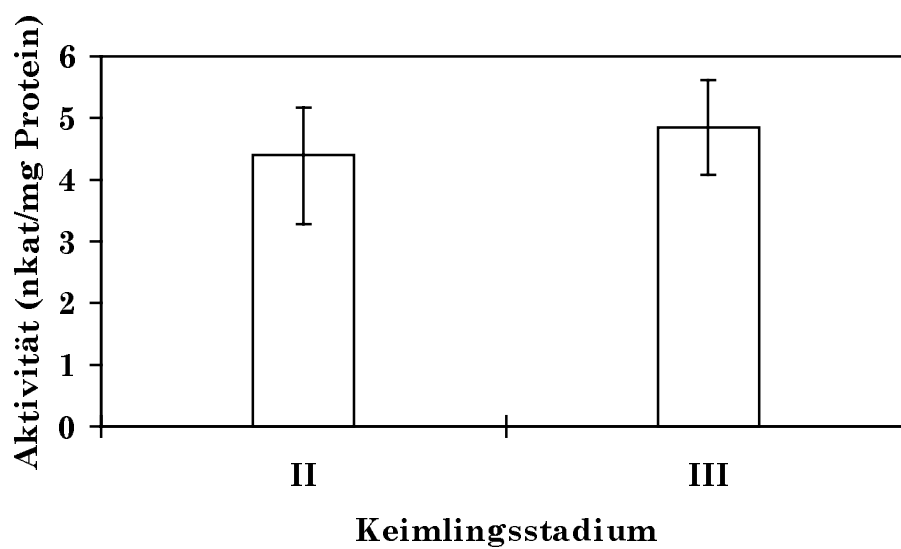
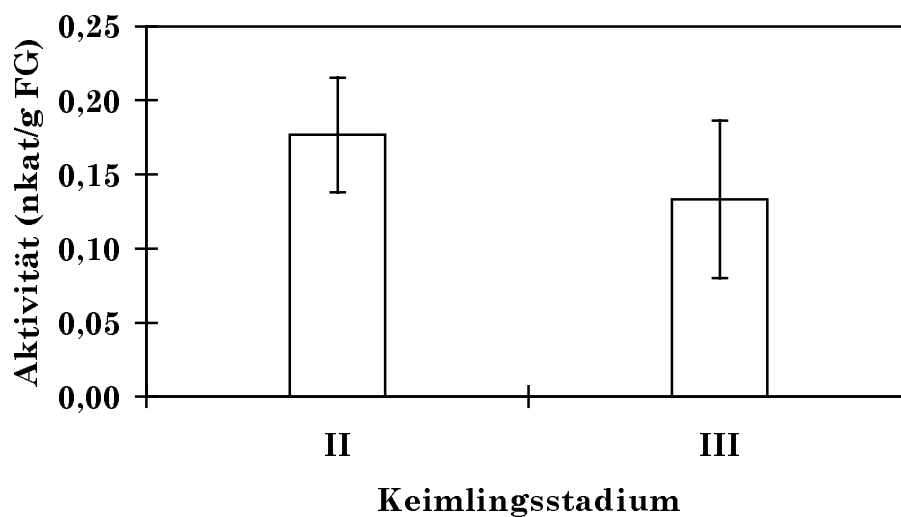
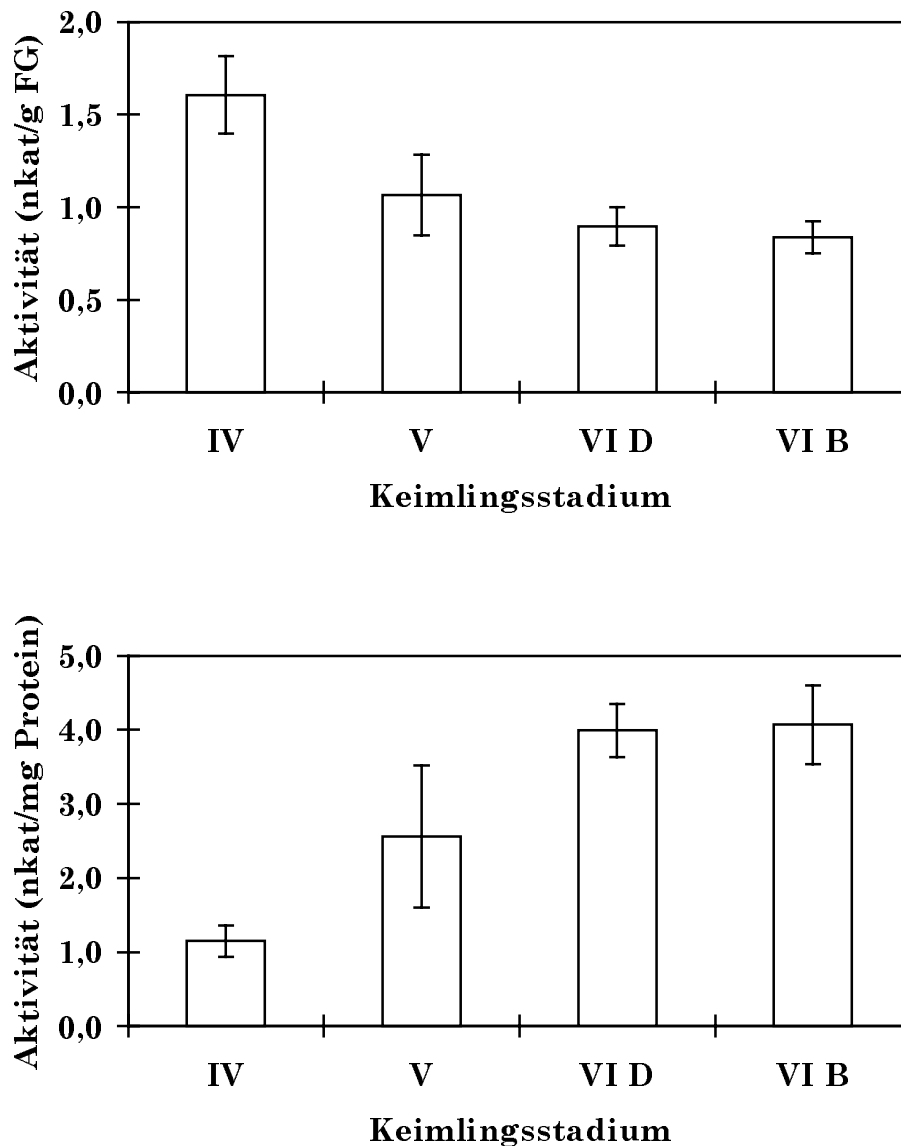


Abbildung 27 **ti it teine se uentiellen iglu sidase in**
unte s iedli en nt i lungs asende l tte



Legende zu den Abbildung 23 bis 27:

Die Nieder- und Hochsalzproteinextrakte der einzelnen *Hevea*-Keimlingsorgane wurden gemäß Kapitel 2.2.2 hergestellt. Die Bestimmung der Aktivität der sequentiellen Diglucosidase erfolgte nach Abtrennung der niedermolekularen Stoffe über PD 10-Säulen gemäß Kapitel 2.7.2 mit Amygdalin als Substrat (Bestimmung der Glucose- und Cyanidfreesetzung). Die dargestellten Aktivitäten setzen sich aus den bestimmten Aktivitäten in den Niedersalz- und Hochsalzextrakten (dunkle bzw. helle Balken) zusammen. Die Proteinbestimmung wurde gemäß Kapitel 2.9.1 mit der Methode nach Bradford durchgeführt. Die Einteilung der unterschiedlichen Sämlingsstadien erfolgte entsprechend Abbildung 22. Die dargestellten Aktivitäten sind Mittelwerte aus drei Aufarbeitungen der einzelnen Gewebe, die sich aus jeweils fünf Samen bzw. Pflanzen präparieren ließen. Die Standardabweichung ist in den einzelnen Diagrammen durch Fehlerindikatoren dargestellt.

In den Abbildungen sind als dunkle Balken die Aktivitäten der sequentiellen Diglucosidase in den Niedersalzextrakten dargestellt. Diese bestimmten Aktivitätswerte liegen bei einem Vergleich mit den von Selmar (1986) in unterschiedlich entwickelten *Hevea*-Samen bzw. -Keimlingen bestimmten Aktivitäten einer Diglucosidase in etwa der gleichen Größenordnung (siehe Kapitel 4.6.4).

- *Endosperm:*

Die Summe der Aktivitäten der sequentiellen Diglucosidase, die sich in Nieder- und Hochsalzextrakten aus *Hevea*-Endosperm nachweisen ließ, zeigte eine unterschiedliche Verteilung der Aktivität der verschiedenen Extrakte im Verlauf der Keimlingsentwicklung. Im Sämlingsstadium 0 ließen sich 4 % der Gesamtaktivität im Niedersalzextrakt nachweisen (bezogen auf den ermittelten Proteinwert im Niedersalzextrakt). Im Keimlingsstadium V ging dieser im Niedersalzextrakt nachweisbare Aktivitätsanteil der sequentiellen Diglucosidase dann auf 1,5 % zurück. Vermutlich sind die Zellwände in den Entwicklungsstadien unterschiedlich ausgebildet, so daß die sequentielle Diglucosidase nach einer Homogenisation der Gewebe der frühen Stadien nicht vollständig postmortal an das Zellwandmaterial binden kann.

Entsprechend des "Linustatin-Wegs" wird Linamarin in Form von Linustatin während der Keimung aus dem Endosperm in die anderen Gewebe exportiert (Selmar, 1986). Bei den nachgewiesenen Aktivitäten der sequentiellen Diglucosidase könnte es sich um Restaktivitäten des Enzyms aus der Beladungsphase des Endosperms während der Samenbildung mit dem Diglucosid Linustatin handeln. Des weiteren sollte eine cyanogene Pflanze auch in jedem Organ in der Lage sein, cyanogene Diglucoside hydrolysieren zu können (z. B. bei einem Angriff von Herbivoren als "Repellent"-Wirkung).

- *Kotyledonen:*

Bei den Kotyledonen lag ein ähnlicher entwicklungsabhängiger Verlauf der Aktivität der sequentiellen Diglucosidase vor wie beim Endosperm. Auch hier erfolgte ein stetiger Anstieg der Aktivität bis zum Stadium II. Im Stadium III ließ sich eine etwas niedrigere Aktivität nachweisen. Der Höchstwert der Aktivität der sequentiellen Diglucosidase war wie im Fall des Endosperms beim Übergang des

Entwicklungsstadiums III zum Stadium IV feststellbar. In diesem Entwicklungsbereich (Stadium III bis Stadium IV) konnte Selmar (1986) den Transportmetabolit Linustatin in Exsudaten des Endosperms nachweisen. Gemäß des "Linustatin-Wegs" ist damit in den Kotyledonen (*physiological sink*) ein Enzym vorhanden, welches das in das Gewebe eintransportierte Diglucosid Linustatin zum Linamarin hydrolysieren könnte.

- *Wurzel:*

In den Wurzeln ließ sich nur im Entwicklungsstadium II und III die Aktivität einer sequentiellen Diglucosidase nachweisen.

- *Sproß:*

Im Sproß erfolgte ein stetiger Anstieg der Aktivität der sequentiellen Diglucosidase in den einzelnen Entwicklungsstadien.

- *Blätter:*

In den Blättern der Keimlingsstadien IV und V, die eindeutig aufgrund ihrer physiologischen Entwicklungsstufe als *sink*-Organe zu bezeichnen sind (Lieberei, 1984), fand ebenfalls ein Anstieg der Enzymaktivität statt.

In allen untersuchten Organen von *Hevea*-Keimlingen (Varietät FX 3864 und FX 2261) konnte eine sequentielle Diglucosidase sowohl in einigen Niedersalzeextrakten als auch in den Hochsalzeextrakten nachgewiesen werden. Damit besitzt jedes Gewebe eines Keimlings ein Enzym (sequentielle Diglucosidase), um den Transportmetaboliten Linustatin nach einer Verlagerung in das entsprechende Gewebe hydrolysieren zu können. Die cyanogenen Glucoside in Keimlingen von *Hevea brasiliensis* können also gemäß dem "Linustatin-Weg" von einem Gewebe der Pflanze in ein anderes transportiert und dort akkumuliert werden.

3.9 Simultane Diglucosidase aus *Davallia bullata*

Als geeignetes Versuchsobjekt für die Reinigung einer simultanen Diglucosidase wurde der Farn *Davallia bullata* verwendet. In dieser Pflanze läßt sich die Aktivität einer simultanen Diglucosidase ausreichend nachweisen, und sie ist genügend stabil. Die Bestimmung der Aktivität der simultanen Diglucosidase kann über die Freisetzung von Blausäure im Anschluß an die Hydrolyse der cyanogenen Diglucosiden erfolgen (Kapitel 2.7.1). Bei der zusätzlichen Durchführung eines Glucosetests wurde bestätigt, daß bei diesem Abbau cyanogener Diglucoside keine Glucose gebildet wird – also kein sequentieller Abbau vorliegt.

Somit bestand ein weiteres Ziel dieser Arbeit in der Reinigung der simultanen Diglucosidase aus *Davallia bullata* bis zur Homogenität. Außerdem erfolgte die biochemische Charakterisierung des Enzyms. In den folgenden Kapiteln werden die einzelnen erfolgreichen Reinigungsschritte der simultanen Diglucosidase dargestellt.

3.9.1. Bestimmung der *in vitro* Aktivität der simultanen Diglucosidase

1. Extraktionsverfahren

Die Reinigung der simultanen Diglucosidase erfolgte aus adulten Wedeln des Farns *Davallia bullata*. Dabei hat sich das Homogenisationsverfahren, welches Lizotte und Poulton (1988) beschreiben, als erfolgreich bewährt. In diesem Verfahren (Kapitel 2.2.3) wurden die Wedel des Farns unter Zusatz von PVPP und Glasperlen mit Imidazol als Puffersubstanz (0,1 M; pH 6,0) homogenisiert. Um den Einfluß der zugesetzten Stoffe abschätzen zu können, wurden die Aufarbeitungen mit und ohne PVPP bzw. Glasperlen durchgeführt. Zusätzlich wurde eine Extraktion durch Homogenisation von Farnwedeln mit McIlvaine-Puffer (pH-Wert: 6,0; 1:10 (v/v) verdünnt) ausgeführt (Kapitel 2.2.1.1). Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 dargestellt.

abelle 14 ti it t de simultanen Diglu sidase aus *Davallia bullata*
na unte s iedli en u a eitungsmet den

Aufarbeitungsmethode	Aktivität der simultanen Diglucosidase aus <i>Davallia bullata</i> (nkat/g FG)
(a) Zusatz von PVPP und Glasperlen	1,42
(b) Sediment der Aufarbeitung mit Triton X behandelt	0
(c) Zusatz von PVPP, ohne Glasperlen	0,98
(d) ohne PVPP, mit Glasperlen	0
(e) ohne PVPP, ohne Glasperlen	0
(f) mit McIlvaine-Puffer (pH 6,0; 1:10 verdünnt)	0
(g) Sediment der Aufarbeitung mit McIlvaine-Puffer mit Triton X behandelt	0,31

Legende zu Tabelle 14:

Es wurden jeweils 5 g Frischgewicht von Wedeln des Farns *Davallia bullata* mit 0,1 M Imidazol-Puffer (pH 6,0) mit und ohne Zusatz von PVPP bzw. Glasperlen gemäß Kapitel 2.2.3 hergestellt (Punkt (a) bis (e)). Anschließend wurde die Aktivität der simultanen Diglucosidase gegenüber dem Substrat Amygdalin (6 mM) bestimmt (Kapitel 2.7.1). Bei der unter Punkt (f) aufgeführten Aufarbeitung wurden die Farnwedel mit McIlvaine-Puffer (pH 6,0; 1:10 (v/v) verdünnt) homogenisiert und gemäß Kapitel 2.2.1.1 aufgearbeitet. Die aus der Aufarbeitung (a) bzw. (f) erhaltene Proteinrohfraktion wurde bei 30.000 x g abzentrifugiert, und das Sediment wurde mit 0,1 %iger Triton X-Lösung für 30 min behandelt (= (b) bzw. (g)). Dann wurde die Aktivität der simultanen Diglucosidase gemäß Kapitel 2.7.1 bestimmt.

Die Homogenisation mit Glasperlen (zur Erhöhung des Zerkleinerungsgrades des eingesetzten Pflanzenmaterials) unter Zusatz von PVPP lieferte einen Enzymextrakt, in dem sich die höchste Aktivität der simultanen Diglucosidase nachweisen läßt. Die Variationen dieses Verfahrens (Punkt (b) bis (e)) lieferten geringere oder keine Aktivitäten des Enzyms. Auch die Herstellung der Proteinrohfraktion (Punkt (f)) nach der Methode gemäß Kapitel 2.2.1.1 führte zu keinem Nachweis (Kapitel 2.2.3) der Aktivität einer simultanen Diglucosidase. Die unter Punkt (g) aufgeführte Aktivität der simultanen Diglucosidase ließ sich hingegen nach Behandlung des abzentrifugierten Sedimentes der Aufarbeitung (f) mit dem nicht ionischen Tensid Triton X nachweisen.

Der Einsatz des Imidazol-Puffers und der Zusatz von PVPP sind also entscheidend, um die Aktivität der simultanen Diglucosidase aus Wedeln von *Davallia bullata* zu isolieren. Somit wurde dieses Extraktionsverfahren unter

Zusatz von PVPP und Glasperlen für die Herstellung der Extrakte zur Reinigung des Enzyms angewendet.

2. Einfluß von Proteaseinhibitoren auf die Aktivität einer simultanen Diglucosidase

Um auszuschließen, daß die Aktivität der Diglucosidase durch proteolytischen Abbau während der Homogenisation vermindert wird, wurde eine Aufarbeitung aus Wedeln von *Davallia bullata* gemäß Kapitel 2.2.3 vergleichend mit und ohne Proteasehemmstoffen (0,5 mM) durchgeführt. Als Inhibitoren wurde ein Gemisch aus Pepstatin A (gegen Aspartylproteasen), Phenylmethysulfonylfluorid (PMSF) (gegen Serinproteasen) und Iodessigsäure (gegen Cysteinproteasen) verwendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Aktivität der simultanen Diglucosidase in Aufarbeitungen aus *Davallia bullata* mit und ohne Zusatz von Proteaseinhibitoren

	Simultane Diglucosidase (pkat/g FG)
ohne Inhibitoren	721
mit Inhibitoren	706

Legende zu Tabelle 15:

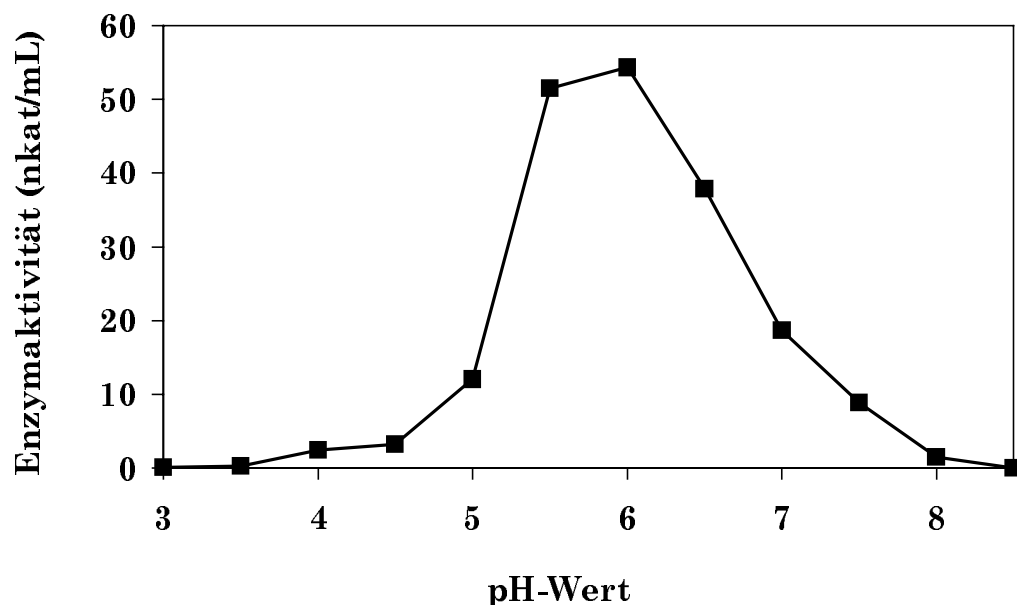
Es wurden Enzymextrakte aus Wedeln von *Davallia bullata* gemäß Kapitel 2.2.2 mit und ohne Zusatz von Proteaseinhibitoren (Pepstatin A, Phenylmethysulfonylfluorid und Iodessigsäure; jeweils 0,5 mM im Standardinkubationsansatz) hergestellt. Die Enzymaktivität der simultanen Diglucosidase wurde gemäß Kapitel 2.7.1 mit Amygdalin (6 mM) als Substrat bestimmt.

Die Verwendung von Proteasehemmstoffen ergab keine Steigerung der Enzymaktivität, so daß in allen weiteren Aufarbeitungen auf den Einsatz dieser Stoffe verzichtet wurde.

3. Einfluß des pH-Wertes auf die Aktivität der simultanen Diglucosidase

Um die Aktivität eines Enzyms quantifizieren zu können, ist es notwendig, den optimalen pH-Wert als wichtigsten Parameter der enzymatischen *in vitro* Reaktion zu bestimmen. In Abbildung 28 ist die pH-Abhängigkeit der simultanen Diglucosidase aus *Davallia bullata* dargestellt.

Abbildung 28 pH-Abhängigkeit der Aktivität der simultanen Diglucosidase



Legende zu Abbildung 28:

Ein bis zur Hydroxyapatitsäule gereinigter Proteinextrakt (siehe Kapitel 2.4.3) einer Aufarbeitung aus Wedeln von *Davallia bullata* wurde bei verschiedenen pH-Werten in einem McIlvaine-Puffer mit Amygdalin als Substrat (6 mM) auf die Aktivität der simultanen Diglucosidase getestet (Kapitel 2.7.1).

Jeder Meßpunkt entspricht dem Mittelwert aus drei Enzymmessungen. Die Standardabweichung lag dabei unter 5 %.

Die pH-Kurve zeigt den typischen Verlauf einer enzymatischen Reaktion mit einem pH-Optimum der simultanen Diglucosidase von 6,0. Das in der Literatur beschriebene pH-Optimum der gereinigten Diglucosidase aus *Davallia trichomanoides* liegt bei pH 5,5 (Lizotte und Poulton, 1988).

4. Einfluß von Effektoren auf die Aktivität der simultanen Diglucosidase

Die Diglucosidase-Aktivität einer gereinigten Proteinfraction aus Blättern von *Davallia bullata* (bis zur Hydroxyapatitsäule; siehe Kapitel 2.4.3) wurde unter Zusatz verschiedener Substanzen mit Amygdalin als Substrat bestimmt, um den Einfluß von potentiellen Effektoren und Inhibitoren zu erfassen. Eingesetzt wurden: Chelatbildner wie Ethylen-Diamin-Tetra-Essigsäure (EDTA), bivalente Ionen wie Ca^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Ag^+ , Cu^{2+} und Reduktionsmittel wie DDT. Die Inkubation erfolgte wie unter Kapitel 2.10 angegeben. In Tabelle 16 sind die entsprechenden Aktivitäten der simultanen Diglucosidase dargestellt.

Tabelle 16: Einfluß von potentiellen Effektoren und Inhibitoren auf die Aktivität der simultanen Diglucosidase

Effektor	Aktivität der simultanen Diglucosidase (%)
Kontrolle	100
EDTA	90
CaCl_2	137
FeCl_3	0
MnCl_2	73
CoCl_2	0
ZnCl_2	148
CuCl_2	66
AgNO_3	19
DDT	105
N-D-Glucosylpiperidin	0
N-D-Galactosylpiperidin	100

Legende zu Tabelle 16:

Die Aktivität der simultanen Diglucosidase aus Wedeln von *Davallia bullata* wurde im Standardinkubationsansatz gemäß Kapitel 2.7.1 mit Amygdalin als Substrat (6 mM) bestimmt (Kapitel 2.10). Als Enzympräparat wurde eine gemäß Kapitel 2.4.3 gereinigte aktive Hydroxyapatitsäulenfraktion der simultanen Diglucosidase verwendet.

Die aufgeführten Werte entsprechen den Mittelwerten aus jeweils drei Messungen. Die Standardabweichung lag dabei unter 5 %.

Zink- und Calciumionen rufen als einzige der getesteten Substanzen eine signifikante Erhöhung der Aktivität der simultanen Diglucosidase um etwa die Hälfte

hervor. Dagegen hemmen Fe^{3+} -Ionen und der klassische β -Glucosidase-Hemmstoff *N*-Glucosylpiperidin die Aktivität vollständig. Im Gegensatz dazu wird die Aktivität durch *N*-Galactosylpiperidin nicht beeinflusst.

3 9 2 ta ilit tsunte su ungen de simultanen Diglu sidase aus *Davallia bullata*

Die simultane Diglucosidase aus *Davallia bullata* wurde im Hinblick auf ihre Stabilität bei unterschiedlichen Lagerbedingungen untersucht. Der gemäß Kapitel 2.2.3 hergestellte Proteinextrakt erwies sich beim Einfrieren bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ als sehr stabil. Somit stellte das Einfrieren und Lagern bereits aufgearbeiteter Enzympräparationen eine geeignete Möglichkeit dar, um jederzeit aktive Enzymfraktionen für unterschiedliche Testsysteme zur Verfügung zu haben. Ein Zusatz von 20 % Glycerin zu den einzelnen Proben beim Einfrieren war erfolgreich. Im Vergleich dazu ist die Aktivität der eingefrorenen Proben ohne Glycerinzusatz um 25 % geringer. Die Enzymproben wurden folglich zur Lagerung bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit Glycerin versetzt. Die Aufbewahrung bei $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Kühlschrank zeigte nach 7 Tagen eine Abnahme der Aktivität um 80 %.

Zusätzlich wurde der Einfluß des verwendeten Extraktionspuffers (0,1 M Imidazol und McIlvaine-Puffer; pH 6,0 1:10 (v/v)) auf die Aktivität der simultanen Diglucosidase untersucht. Die Aktivität des Enzyms, welche sich mit dem 0,1 M Imidazol-Puffer gemäß Kapitel 2.2.3 extrahieren ließ, wurde auf den McIlvaine-Puffer umgepuffert und bei $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Kühlschrank gelagert. Die Abnahme der Aktivität auf 77 % des ursprünglichen Wertes nach sieben Tagen liegt in dem selben Rahmen, wie die beobachtete Aktivitätsabnahme im Imidazol-Puffer. Damit ist die "Nichtextrahierbarkeit" der simultanen Diglucosidase aus den Farnwedeln unter Einsatz des McIlvaine-Puffers (Tabelle 14) nicht mit Stabilitätsproblemen des Enzyms in dieser Lösung zu begründen.

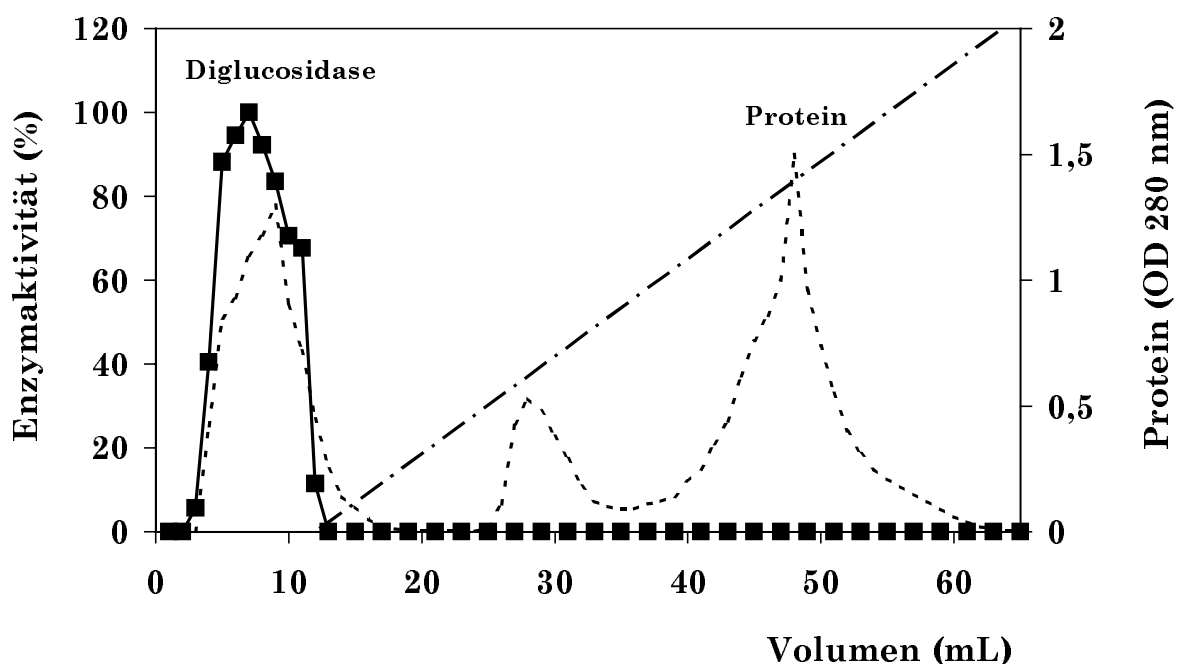
3 9 3 einigung de simultanen Diglu sidase aus *Davallia bullata*

Der gemäß Kapitel 2.2.3 hergestellte Proteinextrakt (Imidazol-Puffer) wurde für die Reinigung der simultanen Diglucosidase aus Wedeln von *Davallia bullata* verwendet. Folgende Reinigungsschritte wurden eingesetzt:

1. Chelating Sepharose High Performance®-Säule mit Nickel als Metallion

Das Trennprinzip einer Chelating Sepharose-Säule basiert auf der Ausbildung koordinativer Bindungen der applizierten Proteine mit den immobilisiert gebundenen Metallionen des Säulenmaterials. Die simultane Diglucosidase aus *Davallia bullata* hat unter den genannten Bedingungen (Kapitel 2.4.1) nicht an die Ni^{2+} -Ionen des Säulenmaterials gebunden und befand sich somit im Ausschlußvolumen. Die Mehrzahl der in der Lösung befindlichen Proteine zeigten jedoch zu den Ni^{2+} -Ionen eine hohe Affinität und wurden von der Säule retardierte. Wie in Abbildung 29 deutlich zu erkennen, bedingt dieser Reinigungsschritt eine Abtrennung von etwa der Hälfte der im Extrakt enthaltenen Proteinen.

Abbildung 29: Elution der simultanen Diglucosidase und des Proteinextrakts aus einer Chelating Sepharose HP®-Säule mit Nickel als Metallion.



Legende zu Abbildung 29:

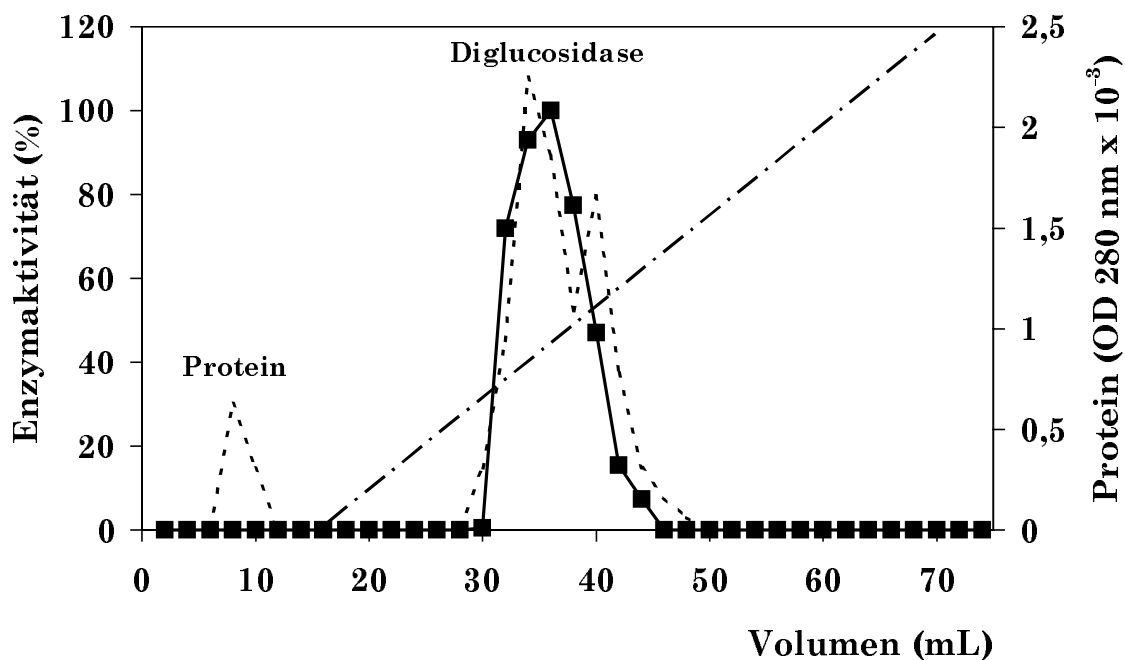
Der Rohproteinextrakt aus Wedeln von *Davallia bullata* wurde über Centriprep 30®-Konzentratoren eingengt, auf den Startpuffer eingestellt und über eine Chelating Sepharose HP®-Säule mit Ni^{2+} als Metallion (Fa. Pharmacia) (Kapitel 2.4.1) aufgetrennt. Startpuffer: Natriumacetat/HCl, 0,1 M; pH 7,3; 0,5 M Natriumchlorid. Die Aktivität der simultanen Diglucosidase ließ sich über die Spaltung des cyanogenen Diglucosids Amygdalin (6 mM) ermitteln (Kapitel 2.7.1) und befand sich im Ausschlußvolumen der Säule. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit einem pH-Gradienten. Das Fraktionsvolumen betrug je 1 mL. Enzymaktivität: 100 % = 2,36 nkat/mL.

Die spezifische Aktivität der simultanen Diglucosidase steigt durch diesen Reinigungsschritt um den Faktor 3. Zur Bilanzierung der einzelnen Reinigungsschritte siehe Kapitel 3.10, Seite 130.

2. DEAE-Sephacel[®]-Anionenaustauscher

Die Fraktionen der Chelating Sepharose[®]-Affinitätschromatographie (Kapitel 2.4.1), welche die simultane Diglucosidase enthielten, wurden über Centriprep 30[®]-Konzentratoren eingengt, auf den Puffer der Anionenaustauscherchromatographie umgepuffert und auf eine DEAE-Sephacel[®]-Säule aufgetragen. Die simultane Diglucosidase bindet unter den gewählten experimentellen Bedingungen an den schwachen Anionenaustauscher DEAE-Sephacel[®] (Fa. Sigma) (Abbildung 30).

Abbildung 30: Elution der simultanen Diglucosidase von einer DEAE-Sephacel[®]-Säule. Die Aktivität der simultanen Diglucosidase wurde über die Spaltung des cyanogenen Diglucosids Amygdalin (6 mM) ermittelt (Kapitel 2.7.1). Das Fraktionsvolumen betrug je 2,5 mL. Enzymaktivität: 100 % = 2,66 nkat/mL.



Legende zu Abbildung 30:

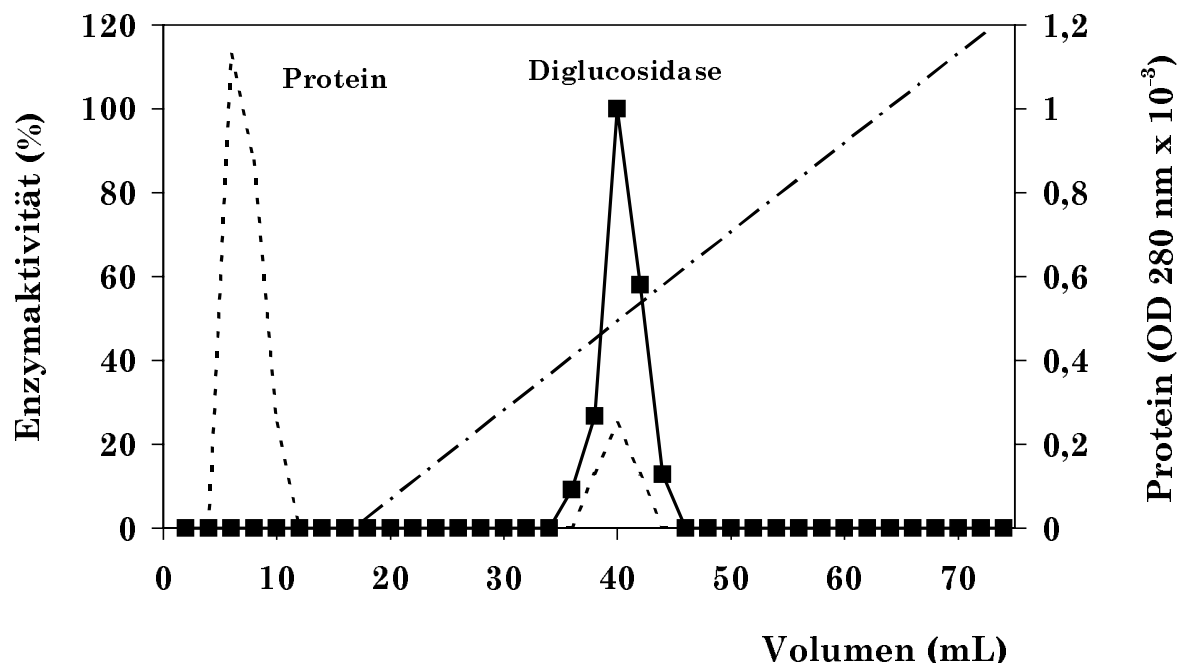
Die Diglucosidase-Fraktionen der Affinitätschromatographie wurden mittels Konzentratoren (Centriprep 30[®], Fa. Amicon) eingengt, auf einen Imidazol-Puffer (20 mM; pH 6,0) eingestellt und auf einen DEAE-Sephacel[®]-Anionenaustauscher (Fa. Sigma) aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem Natriumchlorid-Gradienten (0 – 1 M). Die Aktivität der simultanen Diglucosidase wurde über die Spaltung des cyanogenen Diglucosids Amygdalin (6 mM) ermittelt (Kapitel 2.7.1). Das Fraktionsvolumen betrug je 2,5 mL. Enzymaktivität: 100 % = 2,66 nkat/mL.

Die Elution der Aktivität erfolgte durch einen Natriumchlorid-Gradienten im Bereich einer NaCl-Konzentration von 0,4 – 0,61 M. Bei diesem Reinigungsschritt wurde etwa ein Drittel der aufgetragenen Proteinmenge abgetrennt. Die spezifische Aktivität bleibt bei diesem Schritt erhalten. Zur Bilanzierung der einzelnen Reinigungsschritte siehe Kapitel 3.10, Seite 130.

3. Hydroxyapatit

Die Fraktionen der Anionenaustauscherchromatographie (Kapitel 2.4.2), welche die simultane Diglucosidase enthielten, wurden über Centriprep 30®-Konzentratoren eingengt, auf den Puffer der Hydroxyapatit-Chromatographie (0,001 M Kaliumphosphat-Puffer; pH 7,2) eingestellt und auf eine Hydroxyapatit-Säule aufgetragen. Die Aktivität der simultanen Diglucosidase bindet an diese Säule (Abbildung 31).

Abbildung 31: Elution der Diglucosidase-Aktivität von einer Hydroxyapatit-Säule



Legende zu Abbildung 31:

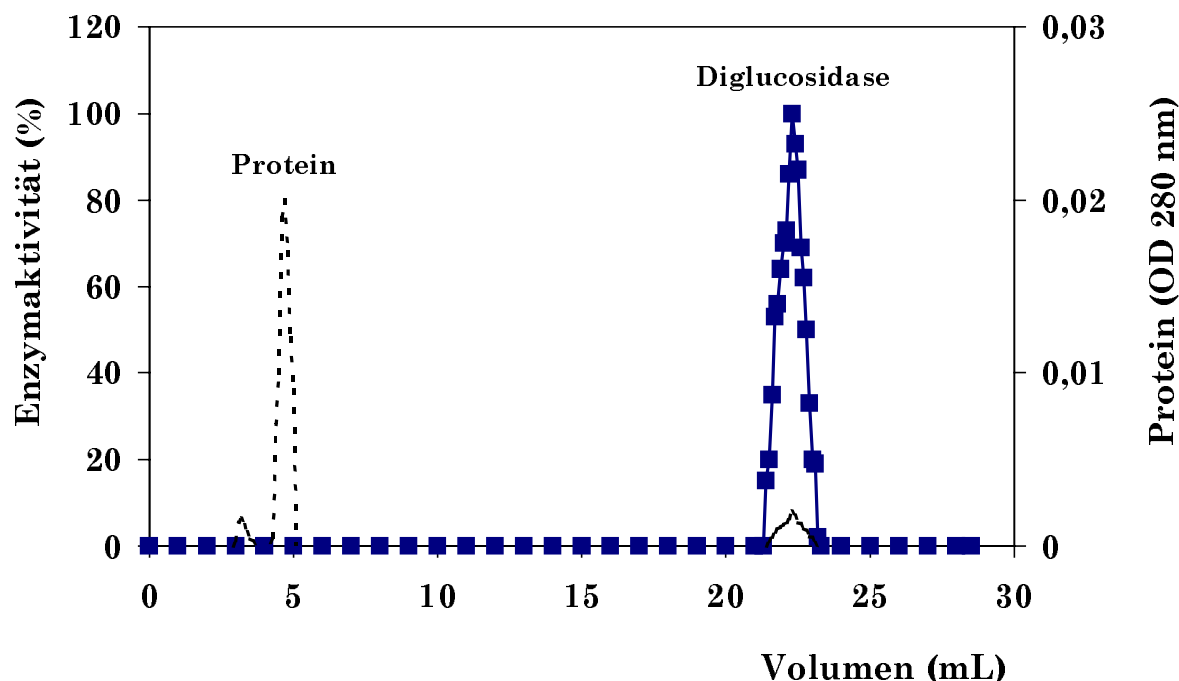
Die Diglucosidase-Fraktionen der Anionenaustauscherchromatographie (Kapitel 2.4.2) wurden mittels Konzentratoren (Centriprep 30®, Fa. Amicon) eingengt, auf einen Kaliumphosphat-Puffer (1 mM; pH 7,2) eingestellt und auf eine Hydroxyapatitsäule (Fa. BIORAD) aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem Kaliumphosphat-Gradienten (0 – 0,1 M; pH 6,8). Die Aktivität der simultanen Diglucosidase wurde über die Spaltung des cyanogenen Diglucosids Amygdalin ermittelt (Kapitel 2.7.1). Das Fraktionsvolumen betrug je 2,5 mL. Enzymaktivität: 100 % = 2,35 nkat/mL.

Die Elution der Aktivität der simultanen Diglucosidase durch die kontinuierliche Erhöhung der Kaliumphosphat-Konzentration im Fließmittel fand in einem Bereich von 51 – 59 mM Kaliumphosphat statt. Die Effektivität dieses Reinigungsschritts ist sehr groß, da etwa 78 % der noch in der Lösung enthaltenen Proteine abgetrennt wurden. Die spezifische Aktivität stieg im Vergleich zum vorherigen Schritt um den Faktor 5. Zur Bilanzierung der einzelnen Reinigungsschritte siehe Kapitel 3.10, Seite 130.

4. Präparative native anionische Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Fraktionen der Hydroxyapatit-Chromatographie (Kapitel 2.4.3), welche die Aktivität der simultanen Diglucosidase enthielten, wurden eingeengt und umgepuffert. Als letzter Reinigungsschritt wurde eine präparative Elektrophorese gemäß Kapitel 2.4.4 durchgeführt. Die Enzymaktivität der simultanen Diglucosidase wurde in einem Bereich von 21 bis 23 mL eluiert. Das erhaltene Elutionsprofil ist in Abbildung 32 dargestellt.

ildung 32 luti ns il de a ati en nati en ani nis en l a lamid elele t ese



Legende zu Abbildung 32:

Die Diglucosidase-Fractionen der Hydroxyapatitsäule (Kapitel 2.4.3) wurden mittels Konzentratoren (Microcon 30[®], Fa. Amicon) eingengt, mit 100 µL des folgenden Puffers 1:2,5 (v/v) verdünnt (0,15 mL Tris/HCl (0,5 M); pH 6,8; 0,5 mL Glycerin; 0,25 mL einer 1 %igen Bromphenolblaulösung und 0,1 mL Wasser) und auf ein 7,5 %iges Trenngel gegeben. Die Elektrophorese wurde in einer Mini Prep Cell[®]-Apparatur (Fa. BIORAD) durchgeführt (Kapitel 2.4.4). Die Elution der durch das elektrische Feld getrennten Proteine erfolgte mit einem 0,1 M Imidazol/HCl-Puffer (pH 6,0). Die Aktivität der simultanen Diglucosidase wurde über die Spaltung von p-Nitrophenyl-β-D-glucosid (Kapitel 2.4.4) in Mikrotiterplatten bestimmt. Das Fraktionsvolumen war je 0,25 mL. Die eluierte Aktivität betrug 0,8 nkat/mL.

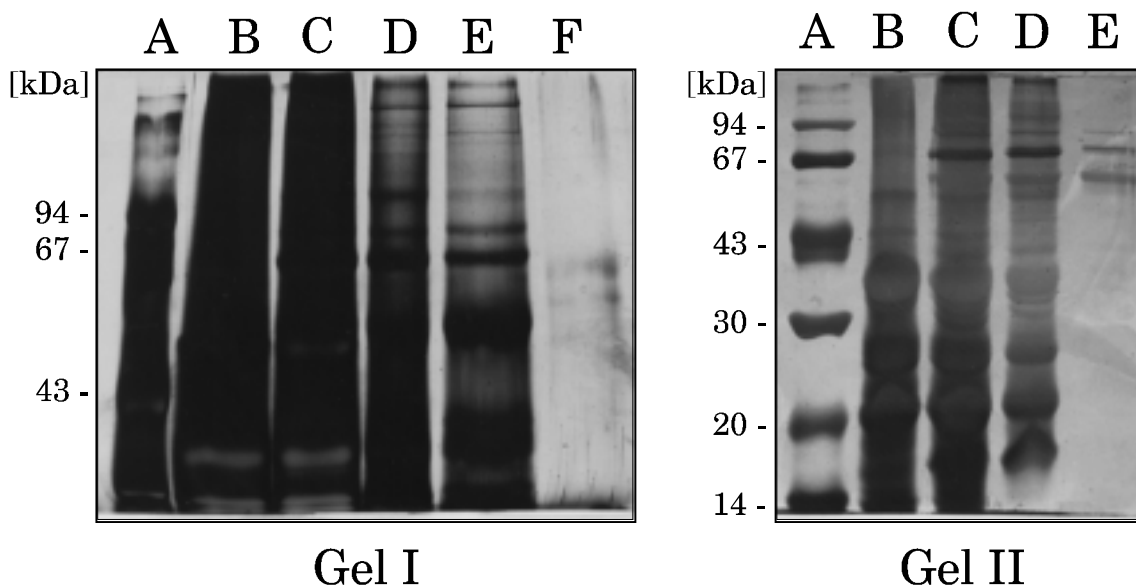
Aufgrund der großen Anzahl der eluierten Fraktionen wurde die Detektion der simultanen Diglucosidase nicht über den Standardinkubationsansatz mit Amygdalin als Substrat durchgeführt, sondern erfolgte in Mikrotiter-Platten über die Spaltung von p-NPG (Kapitel 2.4.4). Die aktiven Fraktionen wurden anschließend vereinigt und auf ihre Fähigkeit zur Hydrolyse des cyanogenen Diglucosids Amygdalin hin untersucht. In diesen Fraktionen ließ sich nach der Inkubation mit Amygdalin nur eine Cyanid- und keine Glucosefreisetzung nachweisen, ein eindeutiger Beweis für das Vorliegen einer simultanen Diglucosidase. Dieser letzte Reinigungsschritt führt zu einer aufgereinigten Probe der

simultanen Diglucosidase. Zur Bilanzierung der einzelnen Reinigungsschritte siehe Kapitel 3.10, Seite 130.

5. Dokumentation der Reinigung der simultanen Diglucosidase aus *Davallia bullata*

Zur Überprüfung der Effektivität der Proteinreinigung wurde von den entsprechenden Diglucosidase-Fractionen der einzelnen Reinigungsschritte eine denaturierende, diskontinuierliche SDS-PAGE (siehe Kapitel 2.5.4) mit anschließender Silberfärbung durchgeführt (Abbildung 33).

Abbildung 33 Die unten stadienweise dargestellten Reinigungsschritte der simultanen Diglucosidase aus *Davallia bullata*



Legende zu Abbildung 33:

Die SDS-Gele wurden gemäß Kapitel 2.5.4 mit einer Acrylamidkonzentration von 8,7 % im Trenngel nach Laemmli (1970) durchgeführt und anschließend gemäß Kapitel 2.5.5 mit einer Silberfärbung behandelt. Die einzelnen aufgetragenen Proteinlösungen entsprechen den durchgeführten Reinigungsstufen der simultanen Diglucosidase. Die Menge der aufgetragenen Enzymaktivität betrug 15 pkat (Gel I) und 7 pkat (Gel II) pro Spur. In Gel I sind alle Stufen der Enzymreinigung dargestellt. Auf Gel II sind zur besseren Veranschaulichung die Reinigungsstufen bis einschließlich der Hydroxyapatit-Säule aufgetragen. Spur A: Molekulargewichtsstandard, B: Rohhomogenat, C: Ni^{2+} -Chelating-Säule, D: DEAE-Sephacel®-Säule, E: Hydroxyapatit-Säule, F: Präp. native anionische Elektrophorese.

In der hochgereinigten Fraktion sind noch drei Proteinbanden sichtbar. Ein analoges Ergebnis wurde von Lizotte und Poulton (1987) für die Diglucosidase aus *Davallia trichomanoides* beschrieben. Aus dem Vergleich mit den aufge-

tragenen Kalibrierproteinen lassen sich folgende Größen für die Untereinheiten der simultanen Diglucosidase (Spur F) bestimmen: 72 , 62 und 53 kDa.

3.10 Bilanzierung der Reinigungsschritte der simultanen Diglucosidase aus *Davallia bullata*

In der folgenden Tabelle 17 wird der Verlauf der Reinigung der simultanen Diglucosidase noch einmal zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 17 Reinigung der simultanen Diglucosidase aus *Davallia bullata*

Fraktion	Protein-Menge (mg)	Aktivität (nkat)	Spezifische Aktivität (nkat/mg)	Reinigungsfaktor
Rohhomogenat	56	81	1,4	1
Ni ²⁺ -Chelating-Säule	30	128	4,2	3
DEAE-Anionenaustauscher	19	91,4	4,7	3,3
Hydroxyapatit	2,3	54,5	23,4	16,3
Präp. native PAGE	0,08	4,5	56,5	39

Legende zu Tabelle 17:

Die Aktivität der simultanen Diglucosidase wurde über die Spaltung von Amygdalin (6mM) ermittelt (Kapitel 2.7.1). Die Proteinbestimmung erfolgte mit NanoOrange® (Kapitel 2.9.2). Rohhomogenat: siehe Kapitel 3.9.1 Punkt 1., Ni²⁺-Chelating-Säule: siehe Kapitel 3.9.3 Punkt 1., Anionenaustauscher: siehe Kapitel 3.9.3 Punkt 2., Hydroxyapatit: siehe Kapitel 3.9.3 Punkt 3., Präp. native anionische PAGE: siehe Kapitel 3.9.3 Punkt 4.

Der geringe Reinigungsfaktor von 39 ist hauptsächlich darauf zurückzuführen, daß die Aktivität der Diglucosidase im Zuge der sehr effizienten präparativen nativen anionischen Gelelektrophorese sehr stark abnimmt.

3.11 Charakterisierung der simultanen Diglucosidase aus *Davallia bullata*

1. Bestimmung des Molekulargewichtes der nativen Form

Die Bestimmung des Molekulargewichtes der nativen Form der simultanen Diglucosidase erfolgte über eine Superdex 200[®]-Säule. Als Kalibrierproteine wurden folgende Substanzen verwendet: Cytochrome C 12 kDa, Ovalbumin 42 kDa, BSA 69 kDa, Aldolase 158 kDa, Catalase 232 kDa, Ferritin 440 kDa und Thyroglobulin 669 kDa verwendet. Die Durchführung der Gelfiltration erfolgte wie unter Kapitel 2.4.5 angegeben. Es ergab sich ein Molekulargewicht der nativen Form der simultanen Diglucosidase aus *Davallia bullata* von 180 kDa. Vergleichend zur denaturierenden SDS-PAGE ist damit festzustellen, daß dieses Enzym als Heterotrimer vorliegt.

2. Ist die simultane Diglucosidase ein Glycoprotein?

Die simultane Diglucosidase aus *Davallia bullata* zeigte keine Bindung an Affinitätssäulen des Lectins Concanavalin A und keine positive Periodsäure-Silberfärbung Reaktion (Dubray und Bezard, 1982). Damit ist dieses Enzym kein Glycoprotein. Die von Lizotte und Poulton (1988) beschriebene Diglucosidase aus *Davallia trichomanoides* ist ebenfalls kein Glycoprotein (keine Bindung an Con A; negative Färbereaktion mit Periodsäure-Schiffes Reagenz).

3. Substratspezifität der simultanen Diglucosidase aus *Davallia bullata*

Das bisher untersuchte Substratspektrum der simultanen Diglucosidase aus *Davallia bullata* zeigt eine deutliche Präferenz dieses Enzyms für cyanogene Diglucoside. So wird das cyanogene Diglucosid Amygdalin in Gegenüberstellung zum Monoglucosid Prunasin um 30 % der Aktivität bevorzugt. Das artifizielle Substrat p-NPG wird deutlich schlechter umgesetzt (nur 6,6 % der Aktivität bei der Spaltung von p-NPG im Vergleich zur Spaltung des Amygdalins). Es erfolgt auch keine Spaltung der Zuckerderivate des 4-Methylumbelliferons (4-Methylumbelliferyl- β -D-glucosid, -cellobiosid, -lactosid) durch die simultane Diglucosidase.

4 Diskussion

4.1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den verschiedenen Möglichkeiten der enzymatischen Hydrolyse cyanogener Diglucoside. Dieses Thema ist in der Literatur schon früh bearbeitet worden. Bereits Wöhler und Liebig (1837) beschrieben, daß das in verschiedenen *Rosaceae*-Arten vorkommende cyanogene Glucosid Amygdalin durch einen Enzymextrakt aus den Kernen dieser Arten, dem sogenannten Emulsin, gespalten wird. In anderen Studien mit Hefeextrakten (Fischer, 1895) und Mandelemulsin (Armstrong et al., 1912) wurde dargestellt, daß die verletzungsbedingte Hydrolyse cyanogener Glycoside bei der Cyanogenese durch einen dreistufigen Mechanismus erfolgt (bei *Rosaceae*):

- (1) Das cyanogene Diglucosid Amygdalin wird zum Monoglucosid Prunasin und Glucose (Amygdalin-Hydrolase),
- (2) das Monoglucosid Prunasin wird zu Mandelonitril und Glucose (Prunasin-Hydrolase), und
- (3) das Mandelonitril wird zu Benzaldehyd und Blausäure gespalten (Mandelonitril-Lyase).

Dieser enzymatische Abbauweg wurde in der Literatur als sequentieller Mechanismus bezeichnet. Im Gegensatz dazu erfolgt beim sogenannten simultanen Mechanismus die vollständige Hydrolyse cyanogener Diglucoside unter Bildung des entsprechenden α -Hydroxynitrils und eines Disaccharids.

Haisman und Knight (1967) bestätigten die Einteilung der unterschiedlichen hydrolytischen Enzyme im Sinne eines sequentiellen Hydrolysemechanismus, durch erste chromatographische bzw. elektrophoretische Trennungen und kinetische Untersuchungen an Mandelemulsin. Dabei konnte der Abbau der cyanogenen Diglucoside nach einem simultanen Mechanismus nicht nachgewiesen werden.

In den darauf folgenden Jahren beschrieben Kasai et al. (1981) bzw. Fan und Conn (1983) einen sequentiellen Abbau auch für die cyanogenen Diglucoside Vicianin aus *Vicia angustifolia* und Linustatin aus *Linum usitatissimum*.

Ein simultaner Mechanismus wurde lediglich für die Hydrolyse von Vicianin in *Davallia trichomanoides* nachgewiesen (Kuroki et al. 1984).

Kuroki et al. (1984) faßten die unterschiedlichen Hydrolysemechanismen, denen die Diglucoside Amygdalin in *Prunus serotina* bzw. Vicianin in *Davallia trichomanoides* bei der Cyanogenese unterworfen sind, zusammen.

- Bei *Prunus serotina* lassen sich zwei β -Glucosidasen nachweisen (sequentieller Spaltungsweg). Eine Amygdalin-Hydrolase, die die Spaltung des cyanogenen Diglucosids Amygdalin zum Monoglucosid Prunasin katalysiert, welches durch eine Prunasin-Hydrolase weiter in das entsprechende α -Hydroxynitril und Glucose zerlegt wird. Dabei läßt sich eine ausgeprägte Substratspezifität in bezug auf das in *Prunus serotina* vorkommende Glucosid beobachten; die Amygdalin-Hydrolase hydrolysiert nur das endogene Diglucosid Amygdalin, während die Prunasin-Hydrolase nur das Monoglucosid spaltet.
- Bei *Davallia trichomanoides* liegt ein simultaner Spaltungsweg cyanogener Diglucoside vor. Aus den Wedeln der Pflanze läßt sich eine Diglucosidase isolieren, die durch Hydrolyse aus dem cyanogenen Diglucosid Vicianin das Disaccharid Vicianose und Mandelonitril bildet.

In der Literatur wurden die Abbaureaktionen, denen die cyanogenen Glucoside unterworfen sind, nur in bezug auf eine verletzungsbedingte Cyanogenese betrachtet. Nun äußerte aber Robinson (1930) die Vermutung, daß die cyanogenen Glycoside nicht nur für eine Repellentwirkung (Jones, 1981) gegenüber Herbivoren verantwortlich sind, sondern möglicherweise auch als Stickstoffspeicher in der Pflanze fungiert. Bei einer Metabolisierung dieser Speicherverbindungen käme es zwangsläufig zu einer Hydrolyse und damit zur "*in vivo*" Freisetzung von toxischer Blausäure in der Pflanze. Blumenthal et al. (1963) konnten zeigen, daß Pflanzen mit dem Entgiftungssystem der β -Cyanoalaninsynthase (β -CAS) eine effektive Möglichkeit besitzen, um Blausäure zu entgiften. Dabei wird Blau-

säure an Cystein gebunden. Das entstehende β -Cyanoalanin hydrolysiert weiter zu Asparaginsäure, so daß der Stickstoff in den allgemeinen Aminosäurepool eingespeist werden kann. Damit steht die β -CAS am Ende einer Reaktionskette, die von den cyanogenen Glucosiden ausgeht.

Erste Untersuchungen zur Metabolisierung von cyanogenen Glucosiden wurden an Keimlingen von *Sorghum vulgare* durchgeführt. Bough und Gander (1971) postulierten, daß in Keimlingen von *Sorghum* ein Turnover des cyanogenen Glucosides Dhurrin stattfindet. Bei diesen Untersuchungen wurde versäumt zu überprüfen, ob Blausäure an die Umgebung abgegeben wurde. Untersuchungen an *Phaseolus lunatus* legten nahe, daß ein Transport von cyanogenen Glycosiden innerhalb der Pflanze stattfindet (Clegg und Conn, 1979).

Umfassende Studien zum Transport und zur Metabolisierung cyanogener Glycoside wurden von Selmar et al. (1988) an Keimlingen von *Hevea brasiliensis* durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, daß das HCN-Potential während der Keimlingsentwicklung bilanziert über die ganze Pflanze abnahm (Lieberei et al., 1985; Selmar et al., 1988). Damit mußte postuliert werden, daß die cyanogenen Glucoside (in diesem Fall das im Endosperm der Samen vorkommende Monoglucosid Linamarin), ohne Abgabe von Blausäure an die Umgebung, in der Pflanze zu nicht cyanogenen Verbindungen metabolisiert werden. Als potentieller Entgiftungsmechanismus lassen sich in *Hevea brasiliensis* hohe Aktivitäten der β -CAS in jungen Blättern und Wurzeln nachweisen (Selmar et al., 1988). Die Rhodanase, ein Enzym welches z. B. im menschlichen Körper die Entgiftung von HCN übernimmt, zeigte in *Hevea* nur eine geringe Aktivität (Lieberei und Selmar, 1990). Diese Untersuchungen bildeten die Grundlage für den sogenannte "Linustatin-Weg" (Selmar, et al. 1988). Dieser Stoffwechselweg beschreibt die Verlagerung cyanogener Glycoside in *Hevea brasiliensis* und ihre mögliche Metabolisierung am Zielort. Im Zentrum steht hierbei die Überlegung, daß unter der Voraussetzung einer apoplastischen Phloembeladung (Delrot, 1987) der Langstreckentransport cyanogener Monoglucoside (Linamarin und Lotaustralin) durch das Vorkommen einer apoplastischen β -Glucosidase ausgeschlossen ist (Kurzhaus et al., 1989). In *Hevea*-Keimlingen ergibt sich damit folgender Sachverhalt: das im Endosperm des Keimlings vorhandene Monoglucosid Linamarin

wird durch eine Glucosyltransferase mit einem weiteren Glucosemolekül versehen, und es kommt zur Bildung des Diglucosids Linustatin, welches von der Linamarase nicht hydrolysiert wird. Diese Substanz fungiert als sogenannter Transportmetabolit, der innerhalb der unterschiedlichen Gewebe verlagert werden kann (z. B. beim Keimling: vom Endosperm in den Sproß und die sich entwickelnden Blätter oder in der adulten Pflanze von einem ausgewachsenen Blattaustrieb zu einem sich in der Entwicklung befindlichen Blattaustrieb). In den "Zielgeweben" (*sink*) erfolgt die Hydrolyse des cyanogenen Diglucosids Linustatin zum Monoglucosid Linamarin durch die Aktivität einer sequentiellen Diglucosidase. Damit hat eine einfache Verlagerung dieses Sekundärstoffes stattgefunden. Die vollständige Metabolisierung zu nicht cyanogenen Verbindungen wird mit einer Hydrolyse durch die simultane Diglucosidase eingeleitet. Die entstandenen Hydrolyseprodukte können dann in den allgemeinen Aminosäurepool (Primärstoffwechsel) der Pflanze übergehen.

Sollte der in *Hevea* ablaufende Stoffwechselweg der cyanogenen Glucoside auch in anderen cyanogenen Pflanzen zur Verlagerung bzw. Metabolisierung dieser Stoffe genutzt werden, so müßten sich ähnliche Verhältnisse (z. B. hinsichtlich Enzymausstattung, Lokalisierung und Kompartimentierung) nachweisen lassen. In *Linum usitatissimum* wurden sehr ähnliche Verläufe des HCN-Potentials bei der Sämlingsentwicklung gefunden (Frehner et al., 1990). Sagasser (1996) konnte diese Ergebnisse bestätigen und weitergehende Untersuchungen durchführen. Dabei wurde festgestellt, daß unreife Leinsamen nur die cyanogenen Monoglucoside Linamarin und Lotaustralin in ihrem Endosperm speichern. Während der Samenreife steigt der Gehalt an den beiden Monoglucosiden in der Samenschale und im Endosperm. Im weiteren Verlauf der Entwicklung werden im Endosperm und in den Kotyledonen die Diglucoside Linustatin und Lotaustralin akkumuliert. Innerhalb des Samens erfolgt also eine Verlagerung cyanogener Glucoside aus der Samenschale in die embryonalen Gewebe. Das HCN-Potential der Samen erreicht am 12. Tag nach der Befruchtung sein Maximum und geht bis zum 18. Tag drastisch zurück. Während dieser Zeit wird keine Blausäure an die Umgebung abgegeben (Bahn, 1992; Sagasser, 1996). Somit muß, auch in den Leinsamen, eine *in vivo*-Metabolisierung cyanogener Glucoside stattgefunden haben. Die Untersuchungen der vorhandenen enzymatischen Ent-

giftungsreaktionen der toxischen Blausäure zeigten, daß sich eine β -CAS mit einem Aktivitätsmaximum genau zu dem Zeitpunkt in den Geweben (Kotyledonen, Endosperm und Samenschale) bestimmen läßt, an dem der intensivste Abbau cyanogener Glucoside stattfindet. Die Aktivität einer Rhodanase konnte dabei nicht nachgewiesen werden (Sagasser, 1996). In *Hevea* ist die Metabolisierung an eine Translokation der cyanogenen Glycoside gekoppelt. Sollte auch in Lein der Transport der cyanogenen Glycoside über den Apoplasten stattfinden, so ist eine apoplastische Verlagerung des Monoglucosids in dieser Pflanze ebenfalls nicht möglich, da im Apoplasten von *Linum usitatissimum* eine Linamarin spaltende β -Glucosidase nachweisbar ist (Kurzhaus et al., 1989). Somit ist davon auszugehen, daß auch hier das Diglucosid Linustatin als Transportmetabolit für das Monoglucosid fungiert. Fan und Conn (1985) konnten in Leinsamen ein Enzym nachweisen, welches sie als Linustatinase bezeichneten, das in der Lage ist dem Diglucosid nach einem sequentiellen Mechanismus das terminale Glucosemolekül abzuspalten. Eine simultane Diglucosidase konnte in Lein bisher nicht nachgewiesen werden (Sagasser, 1996). Diese experimentellen Daten zeigen für *Linum usitatissimum* die Möglichkeit auf, daß auch in dieser Pflanze der von Selmar et al. (1988) aufgezeigte "Linustatin-Weg" zum Transport cyanogener Glucoside genutzt wird. Eine vollständige Metabolisierung der cyanogenen Glucoside nach einer Verlagerung zu nicht cyanogenen Verbindungen wäre in diesem Fall aber nur möglich, wenn eine symplastische β -Glucosidase vorhanden ist, die das aus der Hydrolyse des Diglucosids durch die sequentielle Diglucosidase stammende Monoglucosid weiter zerlegt.

In den verschiedenen *Prunus*-Spezies ist ein weiteres Beispiel für die Veränderung der Zusammensetzung an cyanogenen Glucosiden während der Samenreifung zu finden. Im Endosperm unreifer Samen läßt sich das cyanogene Monoglucosid Prunasin nachweisen, im reifen Samen beinhalten die Speicherkotyledonen dann das cyanogene Diglucosid Amygdalin. Selmar (1993) konnte in *Prunus domestica* ebenfalls eine apoplastisch vorkommende β -Glucosidase nachweisen, so daß der Transport des Monoglucosids Prunasin vom Endosperm in die Kotyledonen auch hier nicht apoplastisch möglich ist. Somit ist die Situation bei *Prunus* bezüglich der Notwendigkeit einer "hydrolyse-geschützten" Transportform ähnlich wie bei *Hevea*. Aber gegenüber *Hevea brasiliensis* unterscheidet sich

die Kompartimentierung der katabolischen Enzyme von der bei *Linum usitatissimum*, da in *Prunus serotina* sowohl die Amygdalin- als auch die Prunasin-Hydrolase symplastisch lokalisiert sind (Li et al., 1992; Kuroki et al., 1984).

In *Manihot esculenta* konnte Warnecke (1995) eine sequentielle Diglucosidase in sich entwickelnden jungen Blättern und im Zentralzylinder der Wurzel nachweisen (nach der in dieser Arbeit vorgestellten Vorschrift).

4.2 Fungieren cyanogene Diglucoside als Transportmetabolite?

Die oben genannten Beispiele zeigen, daß das Vorhandensein unterschiedlich glucosylierter Formen der einzelnen cyanogenen Glucoside nicht nur in *Hevea brasiliensis* sondern auch in anderen cyanogenen Pflanzen mit den apoplastischen Schritten des Langstreckentransports in Verbindung steht. Bislang wurde in allen daraufhin untersuchten Pflanzen eine β -Glucosidase im Apoplasten nachgewiesen, die das Monoglucosid Linamarin hydrolysiert, aber gegenüber dem Diglucosid Linustatin inaktiv ist (in *Lotus corniculatus* Rissler und Millar, 1977; in *Trifolium repens* Kakes, 1985; in *Phaseolus lunatus* Frehner und Conn, 1987; in *Dimorphotheca sinuata* Grützmacher, 1989; in *Manihot esculenta* Mkpog et al., 1990; Kurzhals und Selmar, 1990). Auch das cyanogene Diglucosid Linustatin konnte in den folgenden Pflanzen nachgewiesen werden (in *Linum usitatissimum* Smith et al., 1980; in *Passiflora pendens* Spencer et al., 1986; in *Phaseolus lunatus* Frehner und Conn, 1987; in *Dimorphotheca sinuata* Frehner und Conn, 1987; in *Acacia farnesiana* Frehner et al. 1987; in *Trifolium repens* Kurzhals et al., 1989; in *Manihot esculenta* Kurzhals et al., 1989; Lykkesfeldt und Møller, 1994).

Selmar (1993) konnte zeigen, daß in Samen von *Prunus spp.* ähnliche Verhältnisse in bezug auf den apoplastischen Transport des cyanogenen Monoglucosids Prunasin in Form des Diglucosids Amygdalin wie in *Hevea* vorliegen.

Der Nachweis des cyanogenen Diglucosids Dhurrin-6'-Glucosid sowohl in Blättern als auch in Guttationstropfen der Sämlinge von *Sorghum bicolor* ist, zu-

sätzlich zu den bereits genannten Beispielen, ein weiterer Beleg dafür, daß die Verlagerung cyanogener Diglucoside analog zum "Linustatin-Weg" in *Hevea* nicht nur auf einige cyanogene Pflanzen beschränkt ist, sondern ein generelles Prinzip darstellt (Selmar, 1996).

4.3 Der simultane Spaltungsweg

Der "Linustatin-Weg" (Selmar, 1986) in seiner ursprünglichen Form, war anhand der Ergebnisse aufgestellt worden, die sich mit der Veränderung des HCN-Potentials und dem zeitlichen Verlauf der Bildung des cyanogenen Diglucosids Linustatin in Keimlingen von *Hevea brasiliensis* beschäftigten. Dabei wurde zunächst nur von einer simultanen Spaltung der importierten Diglucoside ausgegangen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde außerdem der Nachweis einer sequentiellen Diglucosidase in *Hevea* erbracht. Somit konnte eine Alternative zum Abbau der in die *sink*-Gewebe eintransportierten Diglucoside aufgezeigt werden.

4.4 Der sequentielle Spaltungsweg

Selmar (1992) ergänzte die ersten Arbeiten zum "Linustatin-Weg" durch weitere Untersuchungen. Bei der Applikation von ^{14}C -markiertem Linustatin an herauspräparierte Kotyledonen von *Hevea*-Sämlingen ließ sich der Hauptanteil der aufgenommenen Radioaktivität als ^{14}C -Linamarin nachweisen. Linustatin wurde also in Linamarin umgewandelt. In der Pflanze muß demnach ein Enzym – eine Diglucosidase – vorkommen, die das applizierte Diglucosid zu dem analogen Monoglucosid hydrolysiert. Unter der Voraussetzung, daß keine gleichzeitige Neusynthese cyanogener Glucoside stattfindet, bedeutet dies, daß der terminale Glucoserest des Diglucosids Linustatin abgespalten worden war.

Selmar (1986 und 1992) führte seine Untersuchungen nicht nur an Keimlingen, sondern auch an Blattmaterial von *Hevea brasiliensis* durch. Dabei konnte in hypotonischen Blattextrakten lediglich eine simultane Diglucosidase nachgewiesen werden. Die Aktivität einer sequentiellen Diglucosidase konnte in diesen Proteinfractionen nicht detektiert werden. Erst das in dieser Arbeit entwickelte Extraktionsverfahren, bei dem die während der Homogenisation entstandenen

und abfiltrierten Zellwandtrümmer mit Natriumchlorid-Lösung versetzt wurden, lieferte einen Hochsalzproteinrohextrakt, in dem sich die Aktivität einer sequentiellen Diglucosidase bestimmen ließ. Damit konnte erstmals bewiesen werden, daß in *Hevea brasiliensis* sowohl eine simultane als auch eine sequentielle Diglucosidase vorkommen.

4.5 Das Modell *Hevea brasiliensis*

In *Hevea brasiliensis* kommen also zwei verschiedene Diglucosidasen vor, die in der Lage sind cyanogene Diglucoside unterschiedlich zu hydrolysieren. Durch die Aufreinigung und Charakterisierung dieser Enzyme mit der anschließenden Herstellung von Antikörpern, sollte es möglich sein, die komplexen pflanzenphysiologischen Vorgänge bei der Metabolisierung cyanogener Glucoside vor dem Hintergrund des "Linustatin-Wegs" im einzelnen zu klären (z. B. Lokalisierung der Enzyme im Pflanzengewebe; Immunscreening rekombinater DNA-Klone nach Expression; Bestimmung von unterschiedlichen Expressionsmustern der beiden Enzyme in verschiedenen Pflanzenorganen bzw. "Versorgungszuständen" der Pflanze). Andererseits wäre es durch die Ansequenzierung der gereinigten Enzymproben möglich, entsprechende Primer zu synthetisieren, die die komplementäre cDNA identifizieren könnten.

Im Rahmen dieser Arbeit sind erste wesentliche Schritte dieses Vorhabens realisiert worden. Es ist gelungen, die sequentielle Diglucosidase aus Blättern von *Hevea brasiliensis* bis zur elektrophoretischen Homogenität zu reinigen. Bei den entsprechenden Versuchen zeigte sich, daß die simultane Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* nicht mit konventionellen chromatographischen Proteinreinigungsmethoden bearbeitet werden kann, da die Aktivität sehr großen nicht reproduzierbaren Schwankungen unterworfen ist (Kapitel 3.7). In der Literatur ist bislang nur eine weitere Diglucosidase in *Davallia trichomanoides* beschrieben, die in der Lage ist, cyanogene Glucoside nach einem simultanen Spaltungsweg zu hydrolysieren (Lizotte und Poulton, 1988). Somit wurde in dieser Arbeit das analoge Enzym aus den Wedeln des cyanogenen Farns *Davallia bullata* isoliert und charakterisiert.

4.6 Die sequentielle Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis*

4.6.1 Initiativ und unabhängig

Entsprechend der in der Einleitung geschilderten Verlagerungs- und Metabolisierungswege für cyanogene Diglucoside in *Hevea brasiliensis* sollte die sequentielle Diglucosidase als symplastisches Enzym in der Zelle lokalisiert sein. Somit ist es überraschend, daß sich das Enzym zu über 95 % aus den Zellwandtrümmern einer Aufarbeitung aus jungen Blättern unter Hochsalzbedingungen (1,2 M Natriumchlorid-Lösung) isolieren läßt. Dieses Verhalten, welches in der Literatur für einige β -Glucosidasen beschrieben ist (Konno et al., 1996), kann prinzipiell zwei Ursachen haben: zum einen handelt es sich um eine sequentielle Diglucosidase, die *in vivo* an der Zellwand assoziiert ist, oder es kommt zum anderen zu einer postmortalen, artifiziellen Bindung eines symplastischen Enzyms an die Zellwand während der Enzympräparation.

Es lassen sich folgende Argumente für eine artifizielle Adsorption der sequentiellen Diglucosidase nach einer Aufarbeitung an Zellwandtrümmern aufzeigen:

- die Aktivität des Enzyms läßt sich sowohl in den Hoch- als auch Niedersalzproteinextrakten einer Aufarbeitung aus *Hevea*-Blättern (Kapitel 3.1.7) bzw. Endospermgewebe von Keimlingen (Kapitel 3.8) nachweisen. Dabei ließen sich 4 % der gesamten extrahierbaren Aktivität (Summe aus Nieder- und Hochsalzproteinextrakt) der sequentiellen Diglucosidase in einem Niedersalzproteinextrakt aus Endospermgewebe des Keimlingsstadiums 0 nachweisen. Mit zunehmendem Entwicklungsstadium der Samen sinkt dieser Aktivitätsanteil auf unter 1,5 % im Niedersalzextrakt. Diese Verteilung der Aktivität der sequentiellen Diglucosidase in unterschiedlichen Enzymextrakten läßt vermuten, daß die sequentielle Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* sich aufgrund der unterschiedlich ausgebildeten Zellwand in diesen Fällen, nach der Aufhebung der Kompartimentierung durch die Homogenisation, nicht an Zellwandkomponenten bindet.
- Warnecke (1995) konnte zeigen, daß sich die sequentielle Diglucosidase während einer Aufarbeitung aus noch jungen *Manihot*-Blättern des Blatt-

entwicklungsstadiums A erst postmortal an die Zellwände zugesetzter "alter" Blätter des Stadiums D bindet.

- Selmar (1993) führte Infiltrationsversuche intakter *Hevea*- und *Manihot*-Blättern mit den cyanogenen Glucosiden Linustatin und Linamarin durch. Dabei ließ sich bei der Infiltration mit dem Monoglucosid Linamarin eine Blausäurefreisetzung nachweisen, da die apoplastisch vorkommende β -Glucosidase (Linamarase) die Verbindung hydrolysiert hatte. Das Diglucosid Linustatin wurde im Gegensatz dazu nicht hydrolysiert. Somit kann die sequentielle Diglucosidase in diesen Pflanzen nicht apoplastisch vorkommen.

Über die genauen Vorgänge, die zu einer Adsorption der sequentiellen Diglucosidase an das Zellwandmaterial führen, läßt sich bislang keine genaue Aussage machen. Die folgenden Bindungsmöglichkeiten des Enzyms können jedoch als wahrscheinlich erachtet werden:

- eine Bindung über Wasserstoffbrücken, z. B. durch Zuckerreste des Enzyms (die sequentielle Diglucosidase ist eine Glykoprotein, siehe Kapitel 3.2 Punkt 9.) an die Glykoproteine des Zellwandbereiches,
- oder es treten ionische Bindungen zwischen Zellwandbereich und Enzym auf.

In beiden Fällen läßt sich die Bindung durch Zusatz von Natriumchlorid wieder aufheben.

4 6 2 a a t e i s i e u n g d e s e u e n t i e l l e n D i g l u s i d a s e

Substratspezifität

Die aus *Hevea*-Blättern isolierte und gereinigte sequentielle Diglucosidase hydrolysiert sowohl aliphatische als auch aromatische cyanogene Diglucoside bis zum Monoglucosid (Tabelle 8, Seite 90). Im Falle eines aromatischen Monoglucosids erfolgt eine weitere Hydrolyse unter Bildung des entsprechenden α -Hydroxynitrils. Auch in anderen cyanogenen Pflanzen ist diese Spaltungscharakteristik zu beobachten (Kapitel 3.4). Die in der Literatur beschriebenen Enzyme, die mit einem ähnlichen Spaltungsweg cyanogene Diglucoside hydrolysieren wie die sequentielle Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis*, sind die Linustatinase aus *Linum usitatissimum* (Fan und Conn, 1985), die Amygdalin-

Hydrolase aus *Prunus serotina* (Kuroki und Poulton, 1986) und die sequentielle Diglucosidase aus *Manihot esculenta* (Warnecke, 1995). Offensichtlich werden grundsätzlich die Hydrolyseprodukte der in den jeweiligen Pflanzen vorkommenden Diglucoside nicht von den jeweiligen Diglucosidasen weiter gespalten. Damit wird die Hypothese bestätigt, daß die sequentiellen Diglucosidasen für die "Wiederherstellung" der cyanogenen Monoglucoside aus den diglucosidischen Transportmetaboliten verantwortlich sind.

Diese bisher bekannte Kompartimentierung der hydrolytischen Enzyme in *Hevea* hat Konsequenzen für den Abbau cyanogener Diglucoside. Gruhnert et al. (1994) konnten zeigen, daß in *Hevea* und *Manihot* keine Linamarin spaltende β -Glucosidase cytosolisch auftritt, so daß das Linamarin nach einem Langstreckentransport und der Hydrolyse durch die sequentielle Diglucosidase lediglich verlagert worden ist. Ein vollständiger Abbau des Diglucosids Linustatin ist symplastisch nur durch eine simultane Diglucosidase möglich.

In *Prunus serotina* hingegen kann das cyanogene Diglucosid Amygdalin vollständig im Cytosol abgebaut werden, da dort sowohl eine Amygdalin-Hydrolase als auch eine Prunasin-Hydrolase vorkommen (Swain und Poulton, 1994).

Der Name "sequentielle Diglucosidase" für das Enzym aus *Hevea brasiliensis* ist problematisch, da diese Bezeichnung gemäß einer mechanistischen Betrachtungsweise suggeriert, daß die einzelnen Zucker eines Diglucosids hintereinander von einem Enzym abgespalten werden. Dies ist aber nur bei aromatischen Diglucosiden der Fall. Bei dem natürlichen Substrat der sequentiellen Diglucosidase – dem Linustatin – erfolgt nur die Hydrolyse der terminalen Glucose, so daß die Enzymbezeichnung zu Mißverständnissen führen kann. Eine andere Bezeichnung, z. B. "Linustatinase" läßt sich aber nicht mit der Substratspezifität des beschriebenen Enzyms vereinbaren.

Kinetische Parameter

Der Vergleich der sequentiellen Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* mit den vier in der Literatur beschriebenen Enzymen (s. oben) zeigt, daß sehr ähnliche kinetische Eigenschaften, die sich auch mit anderen pflanzlichen β -Glucosidasen vergleichen lassen, vorliegen. So besitzen die Diglucosidasen ein saures pH-Opti-

mum und zeigen eine durch δ -Gluconolacton verursachte kompetitive (*Linum*) bzw. eine nicht kompetitive Hemmung (*Prunus*). Sie haben für ihre natürlichen Substrate einen K_M -Wert im millimolaren Bereich und sind spezifisch gegenüber β -Konfigurationen (Kuroki et al., 1984; Hughes und Dunn, 1982; Cooke et al., 1978; Hösel und Nahrstedt, 1975; Hösel und Klewitz, 1977). Der pI -Wert der Diglucosidasen aus *Linum usitatissimum* und *Prunus serotina* liegt im neutralen bis leicht alkalischen Bereich (bei pH 6,5 bis über 8). Die sequentielle Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* hat ebenfalls einen pI -Wert über pH 8,0 (siehe Seite 100).

Glycoprotein

Die von Kuroki und Poulton (1986) bzw. Fan und Conn (1985) beschriebenen Diglucosidasen müssen Glucose und/oder Mannose in ihren Zuckereinheiten aufweisen, da sie jeweils eine Bindung an Säulen des Lectins Concanavalin A zeigen, und sie sich mit α -Methyl-D-Glucosid eluieren lassen. Kuroki und Poulton (1986) konnten außerdem eine positive Reaktion bei einer Periodsäure-Schiffes Reagenz-Färbung detektieren. Fan und Conn (1985) gelang es durch einen Western Blot der gereinigten Diglucosidase auf Nitrocellulose mit anschließender Detektion über Con A-Peroxidase-Antikörpern zu zeigen, daß das Enzym aus *Linum* ein Glycoprotein ist. Auch die sequentielle Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* ist ein Glycoprotein, welches Glucose- und/oder Mannose-Einheiten im Molekül enthält, da es ebenfalls eine Bindung an eine Con A-Säule zeigt und sich mit α -Methyl-D-Glucosid wieder eluieren läßt (Kapitel 2.6.4).

4 6 3 l e u l a g e i t d e n a t i e n m

Im folgenden erfolgt ein Vergleich der Molekulargewichte der nativen Formen und Untereinheiten der unterschiedlichen β -Glucosidasen, die an der Hydrolyse cyanogener Verbindungen beteiligt sind.

Die sequentielle Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* besteht aus drei Untereinheiten (67, 59 und 57 kDa) (Abbildung 19, Seite 88), das Molekulargewicht der nativen Form läßt sich mit 365 kDa bestimmen (Kapitel 3.4, Seite 88). Die in anderen Pflanzen beschriebenen sequentiellen Diglucosidasen zeigen ein anderes Bild: die glykosylierte Linustatinase aus *Linum usitatissimum* besteht aus zwei

Untereinheiten (19 und 39 kDa) mit einem Molekulargewicht der nativen Form von 56 – 61 kDa und kommt in fünf Isoenzymen vor (Fan und Conn, 1985). Die Amygdalin-Hydrolase aus *Prunus serotina* wird mit einem Molekulargewicht der nativen Form von 60 kDa angegeben. Für dieses monomere Glycoprotein sind zwei Isoenzyme beschrieben (Kuroki und Poulton, 1986).

Die simultane Diglucosidase aus *Davallia bullata* besteht aus drei Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 72, 62 und 53 kDa. Das Molekulargewicht der nativen Form beträgt 180 kDa. Im Vergleich dazu hat die Vicianin-Hydrolase aus *Davallia trichomanoides* ebenfalls drei Untereinheiten (56, 49 und 32,5 kDa), mit einem Molekulargewicht der nativen Form von 340 kDa (Lizotte et al., 1988).

Die in *Linum usitatissimum* beschriebene Linamarase (β -Glucosidase) ist ein Molekül mit einer Anordnung aus zwei Untereinheiten, die jeweils fünfmal im nativen Enzym vorhanden sind (Fan und Conn, 1985). Die β -Glucosidase aus *Hevea brasiliensis* ist ebenfalls ein Glycoprotein, welches aus vielen ineinander überführbaren multiplen Formen besteht. Das Molekulargewicht des Monomers liegt in diesem Fall bei 64 kDa (Selmar, 1986).

Es wäre interessant, die einzelnen gereinigten Enzyme zu sequenzieren und anschließend auf Ähnlichkeiten in den Basensequenzen zu untersuchen. Durch diesen Vergleich könnten z.B. Aussagen über die evolutionären Veränderungen bzw. über die "Verwandtschaft" der einzelnen Enzyme gemacht werden.

4.6.4 ngigkeit der tiitenden Diglucosidasen im ntstadium der Blätter

Bei *Hevea brasiliensis* handelt es sich um eine tropische Nutzpflanze, die den für Holzgewächse typischen Blattaustrieb, die sogenannte Blattausschüttelung zeigt (Walter, 1964). Die sich entwickelnden jungen Blätter stellen *sink*-Gewebe dar. Die sequentielle Diglucosidase läßt sich in allen Blattentwicklungsstadien von *Hevea brasiliensis* nachweisen (Kapitel 3.1). In jungen Blättern (Stadium B₂–C) ist die Aktivität bezogen auf ein Blatt am höchsten. Dies ermöglicht, daß die cyanogenen Glucoside in Form des Transportmetaboliten Linustatin in diese Blätter transportiert werden, dort wieder zum Monoglucosid zurück hydrolysiert

und in den Vakuolen gespeichert werden (gemäß dem "Linustatin-Weg"). Das Vorkommen cyanogener Glucoside im Blattgewebe stellt für die jungen Blätter ein Schutz vor Herbivoren dar (Nahrstedt, 1985).

Die ersten Untersuchungen, die zu der Hypothese des "Linustatin-Wegs" geführt haben, sind an Keimlingen des Wildtypes von *Hevea brasiliensis* durchgeführt worden (Selmar, 1986). Bei diesen Experimenten wurde eine Abnahme des HCN-Potentials während der Sämlingsentwicklung beobachtet. Die Aktivität einer Diglucosidase in den einzelnen Organen der Sämlinge wurde hierbei nur über die Freisetzung von Blausäure aus dem cyanogenen Diglucosid Amygdalin nach einer erfolgten Enzyminkubation bestimmt. Es erfolgte also keine kombinierte Glucose- und Cyanidbestimmung nach dem in dieser Arbeit beschriebenen Verfahren (Kapitel 2.7.2). Zwar wurde in Blattextrakten aus *Hevea* die Aktivität einer simultanen Diglucosidase durch die dünnschichtchromatographische Detektion von Gentiobiose bestimmt, doch der Nachweis, daß auch in Sämlingen eine simultane Diglucosidase vorliegt, ist nicht geführt worden (Selmar, 1986). Es ist also durchaus möglich, daß keine simultane Diglucosidase vorlag, sondern das Vorhandensein einer sequentiellen Diglucosidase und einer β -Glucosidase zu einer vollständigen Hydrolyse der cyanogenen Glucoside geführt haben. Die später von Selmar (1992) durchgeführten Untersuchungen an *Hevea*-Sämlingen zeigten, daß die Abnahme des HCN-Potentials nicht in allen Varietäten abläuft. Es gibt Varietäten (z. B. der in dieser Arbeit untersuchte Typ FX 25), in denen das HCN-Potential während der Sämlingsentwicklung annähernd gleich bleibt ($\sim 240 \mu\text{mol/Sämling}$) und sich nur die Verteilung der cyanogenen Glucoside innerhalb der Pflanze ändert (Selmar, 1992). Bei den Stoffwechselvorgängen, die die cyanogenen Glucoside in Sämlingen betreffen, kann es folglich zur Überlagerung mehrerer Prozesse kommen. So kann gleichzeitig eine Metabolisierung und eine *de novo*-Synthese stattfinden. Da zwischen diesen Prozessen nur mit viel Aufwand differenziert werden kann, ist in dieser Arbeit keine endgültige Aussage über den Umfang der einzelnen Prozesse zu machen.

4 6 5 alisie ung de se uentiellen Diglu sidase

Die genaue *in vivo* Lokalisierung der sequentiellen Diglucosidase im Pflanzengewebe ist nur über den Einsatz von z. B. Immunogoldantikörpern gegen dieses Enzym durch elektronenmikroskopische Aufnahmen möglich.

Die einzige bisher in der Literatur beschriebene Diglucosidase, die über Immunogoldantikörper elektronenmikroskopisch lokalisiert wurde, ist die Amygdalin-Hydrolase aus *Prunus serotina* (Poulton und Li, 1994). Swain et al. (1992) konnten beweisen, daß sich dieses Enzym in reifen Samen in den Proteinbodies des Procambiums der Kotyledonen lokalisieren läßt. Dabei konnte gezeigt werden, daß die Amygdalin-Hydrolase in allen procambialen Zellen nachweisbar ist, die Prunasin-Hydrolase hingegen ist beschränkt auf die periphären Schichten des meristematischen Gewebes. Im Gegensatz zu den Kotyledonen enthalten Blätter von *Prunus serotina* das cyanogene Monoglucosid Prunasin. In diesem Organ läßt sich die Prunasin-Hydrolase in den Vakuolen der Parenchymzellen des Phloems nachweisen. Die Mandelonitril-Lyase, das Enzym welches das entstandene α -Hydroxynitril weiter katabolisiert, ist ebenfalls in den Vakuolen dieses Zelltyps lokalisierbar, jedoch in anderen Gewebezellen als die Prunasin-Hydrolase. Die Lokalisierung der cyanogenen Glucoside Amygdalin und Prunasin ist in *Prunus*-Samen im Parenchym der Kotyledonen durch Gewebeabdrücke nachweisbar. Die Substrate der Prunasin-Hydrolase und der Amygdalin-Hydrolase treten somit nicht in den Zellen des Procambiums oder des Endosperms auf. Diese Kompartimentierung auf Gewebeniveau stellt neben einer Kompartimentierung auf Zellniveau eine Möglichkeit dar, um eine Cyanogenese in der intakten Pflanze zu verhindern (Swain und Poulton, 1994).

Eine Kompartimentierung auf zellulärem Niveau liegt bei *Sorghum bicolor* vor. Kojima et al. (1979) lokalisierten die Dhurrinase in Keimlingen. Dabei wurde festgestellt, daß das cyanogene Monoglucosid Dhurrin in den Vakuolen der Epidermis und die katabolisierenden Enzyme (Dhurrinase, Hydroxynitril-Lyase) sich in den darunter liegenden Mesophyllzellen nachweisen lassen (Saunders und Conn, 1978; Thayer und Conn, 1981). Die Dhurrinase liegt assoziiert an den Plastiden in der Zelle vor (Thayer und Conn, 1981).

Die bisher durchgeführten Lokalisierungsstudien in den cyanogenen Pflanzen *Manihot esculenta*, *Phaseolus lunatus* und *Hevea brasiliensis* zeigen, daß eine Kompartimentierung der cyanogenen Glucoside und ihrer hydrolytischen Enzyme auf subcellulärer Ebene eine Cyanogenese in der intakten Pflanze verhindert (Frehner und Conn, 1987; Kojima et al., 1983; Mkpog et al., 1990; Selmar et al., 1989). Für viele andere cyanogenen Pflanzen ist nur die apoplastische Lokalisierung der β -Glucosidasen nachgewiesen worden (Kakes, 1985). Unklar hierbei ist jedoch, ob dies ausschließlich der Fall ist. Hingegen ist über die Kompartimentierung der cyanogenen Glycoside in den einzelnen Pflanzen nichts bekannt. Der von Selmar (1992) für *Hevea brasiliensis* aufgestellte "Linustatin-Weg" könnte somit ein allgemeines Prinzip zur Verlagerung und Metabolisierung cyanogener Glucoside in Pflanzen darstellen.

Der größte Aktivitätsanteil der sequentiellen Diglucosidase läßt sich aus Zellwandfragmenten von *Hevea*-Blättern extrahieren (Kapitel 3.1.2). In Kapitel 4.6.1 wurde gezeigt, daß es sich bei dieser Adsorption des Enzyms um einen postmortalen Präparationseffekt handelt. Die von Selmar (1993) durchgeführten Infiltrationsversuche mit *Hevea brasiliensis* und *Manihot esculenta* bestätigen diesen Befund. Die sequentielle Diglucosidase in diesen Pflanzen kann somit nicht apoplastisch vorkommen.

Die Biosynthese der cyanogenen Glucoside ist in der Literatur gut untersucht (Møller und Conn, 1980; Halkier et al., 1989; Halkier und Møller, 1990; Koch et al., 1992). Die Synthese in allen untersuchten Pflanzen scheint dabei einem einheitlichen, sehr komplexen Biosyntheseweg zu folgen, an dem ein membrangebundener Multienzymkomplex beteiligt ist. Dieser ist an der cytosolischen Seite des Endoplasmatischen Reticulums lokalisiert. Das cyanogene Monoglucosid Linamarin hingegen wird in der Vakuole akkumuliert (Gruhnert et al., 1994), so daß vom Syntheseort zum Akkumulationsort (Vakuole) im Cytosol ein aktiver Transport dieser Substanzen stattfinden muß. Vergleichbar diesem aktiven Transport der *de novo* synthetisierten cyanogenen Glucoside innerhalb der Zelle, wäre es bei einer Lokalisierung der sequentiellen Diglucosidase im Cytosol prinzipiell möglich, daß ein Teil des apoplastisch transportierten Linustatins bei Ein-

tritt in den Symplasten im Cytoplasma zum Linamarin hydrolysiert werden. Das entstehende Monoglucosid könnte dann in die Vakuole verlagert werden.

Alternativ könnte die sequentielle Diglucosidase in der Vakuole lokalisiert sein. Die in die Zelle transportierten Diglucoside müßten dann durch den Tonoplasten gelangen, in der Vakuole zum Monoglucosid hydrolysiert und dort akkumuliert werden. Diese Annahme wird durch das saure pH-Optimum des gereinigten Enzyms unterstützt (Kapitel 3.1.10).

Die sequentielle Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* besitzt keine Aktivität gegenüber dem cyanogenen Monoglucosid Linamarin (Kapitel 3.4). Damit kann nach einem apoplastischen Transport des Diglucosids Linustatin dieses nur in das Monoglucosid überführt werden. Somit resultiert nur eine einfache Verlagerung des Linamarins in die unterschiedlichen Gewebeteile der Pflanze. In *Hevea brasiliensis* und *Manihot esculenta* konnte die β -Glucosidase nur apoplastisch lokalisiert werden (Gruhnert et al., 1994). Dadurch kann es nicht zu einer vollständigen Hydrolyse des Linustatins über Linamarin in intakten Zellen kommen. Dies bedeutet, daß eine Metabolisierung der cyanogenen Glucoside nicht durch die sequentielle Diglucosidase eingeleitet werden kann. Nur das cytosolische Vorhandensein einer simultanen Diglucosidase könnte zu einer vollständigen Hydrolyse der cyanogenen Diglucoside zu nicht cyanogenen Verbindungen führen.

4.7 Die simultane Diglucosidase aus *Davallia bullata*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, neben der sequentiellen auch die simultane Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* zu reinigen und zu charakterisieren. Die gereinigten Enzymproben sollen wie in Kapitel 4.5 dargestellt für weiterführende Versuche eingesetzt werden. Im Verlauf der Experimente zeigte sich, daß die simultane Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* mit konventionellen proteinchemischen Reinigungsmethoden nur äußerst schwer zu bearbeiten ist (Kapitel 3.7). Deshalb wurde als Alternative eine Pflanze untersucht, in der sich eine simultane Diglucosidase in ausreichender Aktivität nachweisen, isolieren und charakterisieren läßt. Die simultane Diglucosidase (SI) aus dem Farn

Davallia bullata erfüllt diese Bedingungen und konnte im Rahmen dieser Arbeit isoliert und gereinigt werden.

Lizotte und Poulton (1988) beschreiben eine Vicianin-Hydrolase (VH) aus *Davallia trichomanoides*, die dem in dieser Arbeit beschriebenen Enzym in der biochemischen Charakterisierung sehr stark ähnelt. Beide Enzyme bestehen aus drei Untereinheiten (VH: 56; 49; 32,5 kDa; SI: 72; 62; 53 kDa) und besitzen ein hohes Molekulargewicht der nativen Form (VH: 340 kDa; SI: 180 kDa). Das pH-Optimum ist mit 5,5 (VH) bzw. 6,0 (SI) ebenfalls fast identisch. Auch das Substratspektrum der beiden Enzyme ist im Vergleich zu anderen pflanzlichen β -Glucosidasen als relativ spezifisch anzusehen, da nur das endogene cyanogene Diglucosid Vicianin, Amygdalin und die Monoglucoside Prunasin und p-NPG gespalten werden. Eine simultane Diglucosidase ist gemäß des "Linustatin-Wegs" (Selmar, 1992), das einzige symplastische Enzym, welches in der Lage ist, daß zum Teil apoplastisch transportierte Diglucosid Linustatin in der Zelle vollständig abzubauen und somit eine Metabolisierung zu nicht cyanogenen Verbindungen einzuleiten.

4.8 Ausblick

Als weitere Untersuchungen bieten sich nach der erfolgreich durchgeführten Reinigung der simultanen und der sequentiellen Diglucosidasen aus *Davallia bullata* und *Hevea brasiliensis* die Produktion von Antikörpern an. Sofern die gereinigten Antikörper spezifisch für das jeweilige Enzym sind und die Antikörper gegen die simultane Diglucosidase aus *Davallia bullata* eine immunologische Kreuzreaktionen gegen das Enzym aus *Hevea* zeigen, sollte es möglich sein, die simultane Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* zu isolieren. Die Antikörper könnten auch genutzt werden, die Enzyme im Blattgewebe mit Hilfe der Immunogoldmarkierung elektronenmikroskopisch zu lokalisieren. Diese Experimente würden Aufschluß darüber geben, in welchen Geweben die Enzyme vorkommen, welche zelluläre Lokalisierung vorliegt und zu welchen Entwicklungsstadien eine Expression stattfindet. Damit wären detaillierte Aussagen über die Kompartimentierung des "Linustatin-Wegs" möglich.

Das Diglucosid Linustatin stellt in *Hevea brasiliensis* eine Verzweigungsstelle im Stoffwechsel der cyanogenen Glucoside dar. Im Falle einer Metabolisierung zu nicht cyanogenen Verbindungen wird das Diglucosid durch eine simultane Diglucosidase abgebaut und in den Primärstoffwechsel eingespeist. Im Zuge einer einfachen Verlagerung wird Linustatin durch eine sequentielle Diglucosidase zum Monoglucosid Linamarin hydrolysiert und verbleibt im Sekundärstoffwechsel. Damit ist es nach einer Aktivitätsbestimmung beider Enzyme in verschiedenen Pflanzengeweben möglich, eine Aussage über die unterschiedlichen Anteile an Metabolisierung bzw. Verlagerung cyanogener Glucoside in einer Pflanze zu machen. Dieser Verzweigungspunkt stellt damit eine relativ einfache Möglichkeit dar, mit Hilfe gentechnischer Methoden die Konzentrationen cyanogener Glucoside in unterschiedlichen Geweben einer Pflanze zu verändern. Dabei würde z. B. eine höhere Expression der simultanen Diglucosidase und/oder die Unterdrückung der Expression der sequentiellen Diglucosidase dazu führen, daß das HCN-Potential in der Pflanze sinkt. Es würde vermehrt das Hydroxynitril gebildet, welches die cyanogenen Glucoside der Metabolisierung zu nicht cyanogenen Verbindungen zuführt.

Eine Anwendung dieser dargestellten Modifikationen des Stoffwechsels der cyanogenen Glucoside könnte beispielsweise in der Nahrungspflanze Maniok (*Manihot esculenta*) dazu eingesetzt werden, um Veränderungen im HCN-Potential unterschiedlicher Gewebe hervorzurufen. Diese stark cyanogene Pflanze ist in tropischen und subtropischen Ländern eine weit verbreitete trockenresistente Kulturpflanze, aus deren verdickten Wurzelknollen kohlenhydrathaltige Nahrungsmittel für über 300 Millionen Menschen hergestellt werden. Diese Pflanzenprodukte müssen aufbereitet und entgiftet werden, da die endogenen Cyanidgehalte in einigen Varietäten so hoch sind, daß der sofortige Verzehr zu akuten Blausäurevergiftungen führen würde. Es ergeben sich jedoch auch beim häufigen Verzehr von schlecht prozessierten Produkten aus Maniok Erkrankungen. In den meisten Fällen resultieren diese chronischen Intoxikationen durch die stetige Aufnahme subletaler Blausäure-Dosen (Nartey, 1980; Rosling, 1987).

Cyanogene Pflanzen werden aufgrund ihrer Inhaltsstoffe in einem gewissen Umfang vor dem Befall durch Herbivoren geschützt. Dies gilt prinzipiell auch für Kulturpflanzen. Somit erscheint es sinnvoll, die gentechnische Veränderung im Stoffwechsel der cyanogenen Glucoside in Maniok nur in den für die menschliche Ernährung relevanten unterirdischen Wurzelteilen durchzuführen. Dies bedeutet, daß es nicht zu einem *knock out* der Biosynthese kommt, sondern zu Modifikationen der Expression der einzelnen Diglucosidasen in der Wurzel.

Ein weiterer Gesichtspunkt der hier vorliegenden Untersuchungen betrifft die Evolution der unterschiedlichen Glucosidasen (β -Glucosidase, simultane Diglucosidase und sequentielle Diglucosidase). Aus den Sequenzen dieser Enzyme könnten wichtige Rückschlüsse gezogen werden, ob und wie Monoglucosidasen mit Diglucosidasen verwandt sind. In diesem Zusammenhang kommt auch die Aufklärung der Gründe für die stark unterschiedlichen Größen der Untereinheiten eine besondere Rolle zu, speziell die Überlegung, inwieweit dadurch die Substratspezifität beeinflußt wird.

5 Zusammenfassung

In cyanogenen Pflanzen können cyanogene Diglucoside als Transportmetaboliten von "physiologischen *source*-" zu "physiologischen *sink*"-Gewebe fungieren. In dieser Arbeit wurden die Diglucosidasen, die an der Spaltung dieser Transportmetabolite (z. B. das cyanogene Diglucosid Linustatin in *Hevea brasiliensis*) beteiligt sind, untersucht. Diese Spaltung kann entweder sequentiell oder im Zuge eines simultanen Abbaus erfolgen. Im ersten Fall wird durch die sequentielle Diglucosidase lediglich die terminale Glucose der cyanogenen Diglucoside abgespalten, im zweiten Fall findet eine vollständige Hydrolyse durch die simultane Diglucosidase unter Freisetzung von Gentiobiose statt. Die Spaltung des transportierten cyanogenen Diglucosids stellt damit einen Verzweigungspunkt im Stoffwechsel dar. Abhängig vom jeweiligen Hydrolysemechanismus, dem die Diglucoside zugeführt werden, erfolgt eine Verwertung im Primär- bzw. Sekundärstoffwechsel der Pflanze. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit lag somit darin, diese unterschiedlichen Diglucosidasen bis zur Homogenität zu reinigen und biochemisch zu charakterisieren.

Die sequentielle Diglucosidase konnte aus *Hevea brasiliensis* bis zur Homogenität gereinigt werden. Im Gegensatz dazu zeigte es sich, daß die simultane Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* nicht mit konventionellen proteinchemischen Reinigungsmethoden bearbeitet werden konnte, da die Aktivität sehr großen Schwankungen unterworfen ist. Aus diesem Grund wurde die Aufreinigung einer simultanen Diglucosidase aus den Wedeln des Farns *Davallia bullata* durchgeführt. Auch in diesem Fall konnte das Enzym bis zur Homogenität gereinigt und charakterisiert werden.

Diese Arbeit liefert somit die wesentlichen Grundlagen zur Herstellung von Antikörpern gegen die gereinigten Enzyme, um die komplexen pflanzenphysiologischen Vorgänge bei der Metabolisierung cyanogener Glucoside vor dem Hintergrund des "Linustatin-Wegs" (Selmar, 1992) zu klären.

Im einzelnen ergaben sich die folgenden Ergebnisse:

Hevea brasiliensis

- In Blättern von *Hevea brasiliensis* konnte die Aktivität beider Diglucosidase-Typen (simultane und sequentielle Diglucosidase) nachgewiesen werden.
- Für die Unterscheidung der Aktivitäten der unterschiedlichen Diglucosidasen in Pflanzenextrakten aus *Hevea brasiliensis* wurde eine HPLC-Methode mit UV-Detektion entwickelt, mit deren Hilfe die unterschiedlichen Reaktionsprodukte einer enzymatischen Linustatin-Spaltung (Linamarin und Glucose bzw. Acetoncyanhydrin und Gentiobiose) detektiert werden können. Diese Methode basiert auf der Einführung von UV-absorbierenden Benzoat-Gruppen.
- Die sequentielle Diglucosidase besitzt eine hohe Affinität zur pflanzlichen Zellwand und kann nur zu einem Anteil ($\leq 4\%$) im Rahmen einer Standard-Aufarbeitung unter Einsatz hypotonischer Bedingungen isoliert werden. Erst der Einsatz von Hochsalz-Bedingungen (1,2 molare NaCl-Lösung) führt zu einer Ablösung des Enzyms von den Zellwandtrümmern. Die Bindung der sequentiellen Diglucosidase an die Zellwand muß als Präparationsartefakt angesehen werden, der durch eine postmortale Bindung des Enzyms verursacht wird. Durch Infiltrationsversuche konnte belegt werden, daß die sequentielle Diglucosidase *in vivo* nicht in der Zellwand lokalisiert ist (Selmar, 1993).
- Die unter Hochsalzbedingungen lösliche, isolierte sequentielle Diglucosidase ist ein stabiles Enzym, welches sich ohne Aktivitätsverluste über mehrere Monate bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ lagern läßt.
- Im Hochsalzextrakt läßt sich auch eine Linamarin spaltende β -Glucosidase nachweisen. Da die *Hevea*-Linamarase (β -Glucosidase) sehr gut wasserlöslich ist, war es unklar, ob es sich bei der beobachteten β -Glucosidase-Aktivität um die *Hevea*-Linamarase oder eine weitere β -Glucosidase handelt. Durch den Einsatz spezifischer Antikörper ließ sich eindeutig belegen, daß es sich hierbei um Reste der löslichen *Hevea*-Linamarase handelt.

- Die Aktivität der sequentiellen Diglucosidase in Blättern ist stark vom Blattstadium abhängig. Sie ist in jungen Blättern am höchsten und sinkt im adulten Blattstadium ab.
- Die sequentielle Diglucosidase aus Blättern wurde über selektive Extraktion, Ammoniumsulfatfällung, Gelfiltration, Kationenaustauscherchromatographie und präparative native kationische Gelelektrophorese bis zur Homogenität gereinigt (Reinigungsfaktor: 7400). Zur enzymologischen Charakterisierung der Diglucosidase wurde die pH-Abhängigkeit (pH-Optimum: 5,6), die optimale Inkubationstemperatur (50 °C) und das Substratspektrums ermittelt. Die K_M - und v_{max} -Werte für die cyanogenen Diglucoside Amygdalin (K_M : 0,7 mM; v_{max} : 4,4 nkat/mg), Linustatin (K_M : 3,2 mM; v_{max} : 7,7 nkat/mg) und Neolinustatin (K_M : 0,1 mM; v_{max} : 2,3 nkat/mg) sowie für das artifizielle Substrat p-NPG (K_M : 0,4 mM; v_{max} : 1 nkat/mg) belegen, daß es sich bei der sequentiellen Diglucosidase um ein relativ unspezifisches Enzym handelt, welches die Hydrolyse sowohl von aliphatischen als auch von aromatischen cyanogenen Diglucosiden ermöglicht. Bei cyanogenen Monoglucosiden erfolgt die Spaltung nur beim Vorliegen aromatischer Aglyka.
- Die sequentielle Diglucosidase wird durch die typischen β -Glucosidase-Hemmstoffe (*N*-D-Glucosylpiperidin, Castanospermin, Nojirimycin und δ -Gluconolacton) stark inhibiert. Der Zusatz von Manganchlorid verdoppelt die Aktivität.
- Mit Hilfe einer präparativen nativen anionischen Gelelektrophorese und der Extraktion des Proteins aus dem Gel nach einer analytischen nativen kationischen Elektrophorese konnte gezeigt werden, daß die sequentielle Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* aus drei Untereinheiten besteht. Das Molekulargewicht der nativen Form beträgt 365 kDa, die Größe der Untereinheiten 67, 59 und 57 kDa. Die sequentielle Diglucosidase ist ein Glycoprotein.
- In *Hevea*-Keimlingen konnte in allen Stadien eine sequentielle Diglucosidase bestimmt werden. Die höchsten Aktivitätswerte ließen sich im Endosperm und in den Kotyledonen nachweisen.

- In den Blättern einiger *Hevea*-Varietäten konnten signifikante Aktivitäten einer simultanen Diglucosidase bestimmt werden. Die nachweisbaren Aktivitäten dieses Enzyms schwanken sehr stark. Dies ist wahrscheinlich auf drastische Expressionsunterschiede zurückzuführen, deren Ursache bislang nicht geklärt werden konnte. Die simultane Diglucosidase erwies sich als instabil. Sie konnte lediglich unter Einsatz einer Gelfiltration partiell gereinigt werden.

Davallia bullata

- Aus den Wedeln des Farns *Davallia bullata* konnten signifikante Aktivitäten einer simultanen Diglucosidase isoliert werden, allerdings mußten auch hier spezielle Vorkehrungen zur Extraktion und Stabilisierung des Enzyms getroffen werden (Verwendung von PVPP, Glasperlen und Imidazol). Aus den resultierenden Homogenaten konnte die simultane Diglucosidase bis zur Homogenität gereinigt werden. Dabei wurden eine Ni^{2+} -Chelating-Säule, eine Anionenaustauscher-Säule, eine Hydroxyapatit-Säule und eine präparative native anionische Gelelektrophorese verwendet (Reinigungsfaktor: 39). Zur enzymologischen Charakterisierung des Enzyms wurde die pH-Abhängigkeit (pH-Optimum: 6,0) und das Substratspektrum bestimmt. Im Gegensatz zur sequentiellen Diglucosidase ist die simultane Diglucosidase relativ substratspezifisch. Das *Davallia*-Enzym hydrolysiert lediglich die cyanogenen Diglucoside Vicianin und Amygdalin sowie die Monoglucoside Prunasin und p-NPG. Die simultane Diglucosidase wird durch *N*-D-Glucosylpiperidin inhibiert.
- Das Molekulargewicht der nativen Form beträgt 180 kDa, die Größe der Untereinheiten ist 72, 62 und 53 kDa. Die simultane Diglucosidase aus *Davallia bullata* ist kein Glycoprotein.

6 Literaturverzeichnis

- ABROL, Y. P.; CONN, E. E.; STOKER, J. R.: Studies on the identification, biosynthesis and metabolism of a cyanogenic glucoside in *Nandina Domestica* Thunb. In: *Phytochemistry* 5 (1966), 1021-1027
- ADEWUSI, S. R. A.: Turnover of dhurrin in green *Sorghum* seedlings. In: *Plant Physiol.* 94 (1990), 1219-1224
- ALDRIDGE, W. N.: A new method for the estimation of microquantities of cyanide and thiocyanide. In: *Analyst.* 69 (1944), 262-265
- ARMSTRONG, H. E.; ARMSTRONG, E. F.; HORTON, E.: In: *Proc. Roy. Soc.* 85 (1912), 359
- BAHN, A.: *Cyanogene Glucoside und Glucosidasen in Keimlingen von Linum usitatissimum* L. Diplomarbeit an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der TU Braunschweig (1992)
- BEDIAKO, M. K. B.; TAPPER, B. A.; PRITCHARD, G. G.: Metabolism, synthetic site, and translocation of cyanogenic glycosides in Cassava. In: TERRY, E. R.; ODURO, K. A. und CAVENESS, F.: *Tropical Root Crops: Research strategies for the 1980s*. Ottawa, Canada: International Development Research Centre (1981), 143-148
- BLUMENTHAL, S. G.; BUTLER, G. W.; CONN, E. E.: Incorporation of hydrocyanic acid labelled with carbon-14 into asparagine in seedlings. In: *Nature* 197 (1963), 718-719
- BOUGH, W. A.; GANDER, J. E.: Exogenous L-tyrosine metabolism and dhurrin turnover in *Sorghum* seedlings. In: *Phytochemistry* 10 (1971), 67-77
- BRADFORD, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. In: *Anal. Biochem.* 72 (1976), 248-254
- BRIGGS, G. E.; HALDANE, J. B. S.: A note on the kinetics of enzyme action. In: *Biochem. Journal* 19 (1925), 338-339
- BUTLER, G. W.: The distribution of the cyanogenic glucosides linamarin and lotaustralin in higher plants. In: *Phytochemistry* 4 (1965), 127-131

- CASTRIC, P. A.; FARNDEN, K. J. F.; CONN, E. E.: Cyanide metabolism in higher plants, V. The formation of asparagine from β -cyanoalanine. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 152 (1972), 62-69
- CLEGG, J. C. S.; CONN, E. E.: Development fate of the cyanogenic glucoside linamarin in Costa Rican wild lima bean seeds. In: *Nature* 278 (1979), 343-344
- CONN, E. E.: Metabolic studies on natural products: Cyanogenic glycosides and cyanogenesis as possible models. In: *Proceedings of the National Science Council, ROC* 15 (1991), Nr. 4, 220-225
- CONN, E. E.: Cyanogenic compounds. In: *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31 (1980), 433-451
- COOKE, R. D.; BLAKE, G. G.; BATTERSHILL, J. M.: Purification of cassava linamarase. In: *Phytochemistry* 17 (1978), 381-383
- CZAPEK, F.: *Biochemie der Pflanzen* Gustav Fischer Verlag (1921)
- DELROT, S.: Phloem loading: apoplastic or symplastic? In: *Plant Physiol. Biochem.* 25 (1987), Nr. 5, 667-676
- DUBRAY, G.; BEZARD, G.: A highly sensitive periodic acid-silver stain for 1,2-diol groups of glycoprotein and polysaccharides in polyacrylamide gels. In: *Analytical Biochemistry* 119 (1982), 325-329
- ERICKSON, R. O.: Symplastic growth and symplasmic transport. In: *Plant Physiol.* 82 (1986), 1153
- FAN, T. W.-M.; CONN, E. E.: In: *Plant Physiol.* 72 (1983), 128
- FAN, T. W.-M.; CONN, E. E.: Isolation and characterization of two cyanogenic β -glucosidases from flax seeds. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 243 (1985), Nr. 2, 361-373
- FISCHER, E.: In: *Chemische Berichte* 28 (1895), 1508
- FREHNER, M.; CONN, E. E.: The linamarin β -glucosidase in Costa Rican wild lima beans (*Phaseolus lunatus* L.) is apoplastic. In: *Plant Physiol.* 84 (1987), 1296-1300
- FREHNER, M.; SCALET, M.; CONN, E. E.: Pattern of the cyanide-potential in developing fruits. In: *Plant Physiology* 94 (1990), 28-34
- FREHNER, M.; SELMAR, D.; CONN, E. E.: Co-occurrence of linamarin and linustatin. In: *Annual meeting of the Phytochemical Society of North America, USA, Paper 4* (1987)

- GALENSA, R.; SCHÄFERS, F.-I.: Hochleistungsflüssigkeits- und capillargas-chromatographische Bestimmung von para-Hydroxybenzoesäureestern in Lebensmitteln mit komplexer Matrix. In: *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 173 (1981), 279-284
- GORBUNOFF, M. J.: The interaction of proteins with hydroxyapatite. In: *Analytical Biochemistry* 136 (1984), 425-432
- GRUHNERT, C.; BIEHL, B.; SELMAR, D.: Compartmentation of cyanogenic glucosides and their degrading enzymes. In: *Planta* 195 (1994), 36-42
- GRÜTZMACHER, H.: *Untersuchungen zur Cyanogenese in Keimlingen der Kap-Ringelblume Dimorphotheca sinuata* Diplomarbeit an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der TU Braunschweig (1989)
- HAISMAN, D. R.; KNIGHT, D. J.: The enzymic hydrolysis of amygdalin. In: *Biochem. J.* 103 (1967), 528-534
- HALKIER, B. A.; MØLLER, B. L.: The biosynthesis of cyanogenic glucosides in higher plants. Identification of three hydroxylation steps in the biosynthesis of dhurrin in seedlings of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. and the involvement of 1-aci-nitro-2-(p-hydroxyphenyl)-ethane as intermediate. In: *Journal of Biological Chemistry* 265 (1990), Nr. 34, 21114-21121
- HALKIER, B. A.; OLSEN, C. E.; MØLLER, B. L.: The biosynthesis of cyanogenic glucosides in higher plants. In: *Journal of Biological Chemistry* 264 (1989), Nr. 33, 19487-19494
- HANES, C. S.: The determination of enzyme dissociation constants. In: *Biochem. J.* 26 (1932), 1406-1421
- HEUKESHOVEN, J.; DERNICK, R.: Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. In: *Electrophoresis* 6 (1985), 103-112
- HÖSEL, W.: The enzymatic hydrolysis of cyanogenic glucosides. In: VENNESLAND, B.; CONN, E. E. und KNOWLES, C. J.: *Cyanide in Biology*. Academic Press (1981), 217
- HÖSEL, W.; KLEWITZ, O.: Spezifische β -Glucosidasen für das cyanogene Glucosid Triglochinin aus *Alocasia macrorrhiza* Schott. In: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 358 (1977), S. 959-966
- HÖSEL, W.; NAHRSTEDT, A.: Spezifische Glucosidasen für das Cyanglucosid Triglochinin. Reinigung und Charakterisierung von β -Glucosidasen aus *Alocasia macrorrhiza* Schott. In: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 356 (1975), 1265-1275

- HUGHES, M. A.; DUNN, M. A.: Biochemical characterization of the *Li* locus, which controls the activity of the cyanogenic β -glucosidase in *Trifolium repens* L. In: *Plant Molecular Biology* 1 (1982), 169-181
- JONES, D. A.: Cyanide and Coevolution. In: CONN et al.: Cyanide in Biology. Academic Press (1981), 509-516
- KAKES, P.: Linamarase and other β -glucosidases are present in the cell walls of *Trifolium repens* L. leaves. In: *Planta* 166 (1985), 156-160
- KAKES, P.: Properties and functions of the cyanogenic system in higher plants. In: *Euphytica* 48 (1990), 25-43
- KASAI, T.; KISIMOTO, M.; KAWAMURA, S.: On the free sugars and cyanogenic glycosides in the seed of *Vicia angustifolia* var. *segetalis*. In: *Techn. bull. of the Fac. of Agriculture, Kagawa University* 32 (1981), 111-119
- KOCH, B.; NIELSEN, V. S.; HALKIER, B. A.; OLSEN, C. E.; MØLLER, B. L.: The biosynthesis of cyanogenic glucosides in seedlings of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 292 (1992), Nr. 1, 141-150
- KOJIMA, M.; POULTON, J. E.; THAYER, S. S.; CONN, E. E.: Tissue distributions of dhurrin and of enzymes involved in its metabolism in leaves of *Sorghum bicolor*. In: *Plant Physiol.* 63 (1979), 1022-1028
- KOJIMA, M.; IWATSUKI, N.; DATA, E. S.; VILLEGAS, C. D. V.; URITANI, I.: Changes in cyanide content and linamarase activity in wounded cassava roots. In: *Plant Physiol.* 72 (1983), 186-189
- KONNO, H.; YAMASAKI, Y.; KATOH, K.: A β -glucosidase associated with cell walls from cell suspension cultures of carrot. In: *Phytochemistry* 43 (1996), Nr. 6, 1157-1161
- KUROKI, G.; LIZOTTE, P. A.; POULTON, J. E.: Catabolism of (R)-amygdalin and (R)-vicianin by partially purified β -glycosidases from *Prunus serotina* Ehrh. and *Davallia trichomanoides*. In: *Z. Naturforschung* 39 c (1984), 232-239
- KUROKI, G. W.; POULTON, J. E.: Comparison of kinetic and molecular properties of two forms of Amygdalin Hydrolase from Black Cherry (*Prunus serotina* Ehrh.) seeds. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 247 (1986), Nr. 2, 433-439
- KURZHALS, C.; SELMAR, D.; BIEHL, B.: *Tagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft* (1990), Poster 5-8

- KURZHALS, C.; GRÜTZMACHER, H.; SELMAR, D.; BIEHL, B.: Linustatin, the linamarin-glucoside protected against cleavage by apoplastic linamarase. In: *Planta Medica* 55 (1989), 673
- LAEMMLI, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (1970), 680-685
- LI, C. P.; SWAIN, E.; POULTON, J. E.: *Prunus serotina* Amygdalin Hydrolase and Prunasin Hydrolase. In: *Plant Physiol.* 100 (1992), 282-290
- LIEBEREI, R.: *Cyanogenese und Resistenz* Habilitationsschrift an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der TU Braunschweig (1984)
- LIEBEREI, R.; SELMAR, D.: Determination of rhodanase in plants. In: *Phytochemistry* 29 (1990), Nr. 5, 1421-1424
- LIEBEREI, R.; SELMAR, D.; BIEHL, B.: Metabolization of cyanogenic glucosides in *Hevea brasiliensis*. In: *Pl. Syst. Evol.* 150 (1985), 49-63
- LINEWEAVER, H.; BURK, D.: The determination of enzyme dissociation constants. In: *J. Am. Chem. Soc.* 561 (1934), 658-666
- LIZOTTE, P. A.; POULTON, J. E.: Catabolism of cyanogenic glycosides by purified Vicianin Hydrolase from Squirrel's Foot Fern (*Davallia trichomanoides* Blume). In: *Plant Physiol* 86 (1988), 322-324
- LOYD, R. C.; GRAY, E.: Amount and distribution of hydrocyanic acid potential during the life cycle of plants. In: *Agron. J.* 62 (1970), 394-397
- LYKKESFELDT, J.; MØLLER, B. L.: Cyanogenic glycosides in Cassava, *Manihot esculenta* Crantz. In: *Acta Chemica Scandinavica* 48 (1994), 178-180
- MKPONG, O. E.; YAN, H.; CHISM, G.; SAYRE, R. T.: Purification, characterization, and localization of linamarase in Cassava. In: *Plant Physiology* 93 (1990), 176-181
- MØLLER, B. L.; CONN, E. E.: The biosynthesis of cyanogenic glucosides in higher plants. In: *The Journal of Biological Chemistry* 255 (1980), Nr. 7, 3049-3056
- NAHRSTEDT, A.: Cyanogenic compounds as protecting agents for organism. In: *Pl. Syst. Evol.* 150 (1985), 35-47
- NAHRSTEDT, A.: The biology of the cyanogenic glycosides: new developments. In: MENGEL, K. und PILBEAM, D. J.: Nitrogen Metabolism of Plants. Bd. 29. Oxford University Press (1992), 249-269
- NARTEY, F.: Studies on Cassava, *Manihot utilissima* Pohl. In: *Phytochemistry* 7 (1968), 1307-1312

- NARTEY, F.: Cyanide in tropical feeds and foodstuffs. In: VENNESLAND, B. et al.: Cyanide in Biology. Academic Press (1980), 115-132
- ORNSTEIN, L.; DAVIS, B. J.: In: *Anal. NY Acad. Sci.* 121 (1964), 321
- POULTON, J. E.: Cyanogenesis in plants. In: *Plant Physiology* 94 (1990), 401-405
- POULTON, J. E.; LI, C. P.: Tissue level compartmentation of (R)-Amygdalin and Amygdalin Hydrolase prevents large-scale cyanogenesis in undamaged *Prunus* seeds. In: *Plant Physiol.* 104 (1994), 29-35
- PROKSCH, P.: Pflanzliche "Sekundärstoffe" als chemischer Fraßschutz gegen herbivore Insekten. In: *Pharmazie in unserer Zeit* 20 (1991), 217-224
- RISSLER, J. F.; MILLAR, R. L.: Biochemical evidence for the histochemical localisation of linamarase activity in *Lotus corniculatus* infected with *Stemphylium loti*. In: *Protoplasma* 92 (1977), 57-70
- ROBINSON, M. E.: Cyanogenesis in plants. In: *Biochemical Reviews of the University of Cambridge Philosophical Society* 5 (1930), 126-141
- ROSLING, H.: Cassava toxicity and food security Upsala, Schweden: Tryck kontakt (1987)
- ROTHER, G. M.: *Electrophoresis of enzymes*. Lab Manual Springer Verlag (1994), 90-95
- SAGASSER, M.: Änderungen im Spektrum cyanogener Glucoside während der Samenentwicklung von Lein (*Linum usitatissimum* L.) Diplomarbeit an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der TU Braunschweig (1996)
- SAUNDERS, J. A.; CONN, E. E.: Subcellular localization of the cyanogenic glucoside of *Sorghum* by autoradiography. In: *Plant Physiol.* 59 (1977), 647-652
- SAUNDERS, J. A.; CONN, E. E.: Presence of the cyanogenic glucoside dhurrin in isolated vacuoles from *Sorghum*. In: *Plant Physiol.* 61 (1978), 154-157
- SELMAR, D.: Charakterisierung einer gereinigten β -Glucosidase mit Linamarase-Aktivität aus Blättern von *Hevea brasiliensis* Schriftliche Hausarbeit zur wissenschaftlichen Prüfung für das Lehramt an Gymnasien, Botanisches Institut der TU Braunschweig (1982)
- SELMAR, D.: Cyanogenese in *Hevea*. Zwei Wege zur Metabolisierung cyanogener Glycoside Dissertation an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der TU Braunschweig (1986)
- SELMAR, D.: Die Metabolisierung cyanogener Verbindungen Habilitationsschrift an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der TU Braunschweig (1992)

- SELMAR, D.: Transport of cyanogenic glucosides: linustatin uptake by *Hevea* cotyledons. In: *Planta* 191 (1993), 191-199
- SELMAR, D.: Apoplastic occurrence of cyanogenic β -Glucosidases and consequences for the metabolism of cyanogenic glucosides. In: ESEN, A.: Biochemistry and Molecular Biology of β -Glucosidases. Bd. 533. 1. Aufl. American Chemical Society Books (1993), 191-204
- SELMAR, D.; LIEBEREI, R.; BIEHL, B.; NAHRSTEDT, A.; SCHMIDTMANN, V.; WRAY, V.: Occurrence of the cyanogen linustatin in *Hevea brasiliensis*. In: *Phytochemistry* 26 (1987), Nr. 8, 2400-2401
- SELMAR, D.; LIEBEREI, R.; BIEHL, B.: Mobilization and utilization of cyanogenic glycosides. In: *Plant Physiol.* 86 (1988), 711-716
- SELMAR, D.; FREHNER, M.; CONN, E. E.: Purification and properties of endosperm protoplasts of *Hevea brasiliensis* L. In: *J. Plant Physiol.* 135 (1989), 105-109
- SELMAR, D.; LIEBEREI, R.; JUNQUEIRA, N.; BIEHL, B.: Changes in Cyanogenic Glucoside Content in Seeds and Seedlings of *Hevea* species. In: *Phytochemistry* 30 (1991), Nr. 7, 2135-2140
- SELMAR, D.; IRANDOOST, S.; WRAY, V.: Dhurrin-6'-Glucoside, a new cyanogenic diglucoside from *Sorghum bicolor* L. In: *Phytochemistry* 43 (1996), 569-572
- SMITH, C. R.; WEISLEDER, D.; MILLER, R. W. J.: Linustatin and Neolinustatin: cyanogenic glycosides of linseed meal that protect animals against selenium toxicity. In: *J. Org. Chem.* 45 (1980), 507-510
- SPENCER, K. C.; SEIGLER, D. S.; NAHRSTEDT, A.: Linamarin, lotaustralin, linustatin and neolinustatin from Passiflora species. In: *Phytochemistry* 25 (1986), 645-647
- SWAIN, E.; POULTON, J. E.: Immunocytochemical localization of Prunasin Hydrolase and Mandelonitrile Lyase in stems and leaves of *Prunus serotina*. In: *Plant Physiol.* 106 (1994), 1285-1291
- SWAIN, E.; LI, C. P.; POULTON, J. E.: Tissue and subcellular localization of enzymes catabolizing (R)-Amygdalin in mature *Prunus serotina* seeds. In: *Plant Physiol.* 100 (1992), 291-300
- THAYER, S. S.; CONN, E. E.: Subcellular localization of dhurrin β -Glucosidase and Hydroxynitrile Lyase in the mesophyll cells of *Sorghum* leaf blades. In: *Plant Physiol.* 67 (1981), 617-622

- WALTER, H.: *Die Vegetation der Erde*. Bd. 1. Gustav Fischer Verlag 1. Aufl. (1964), 111-113
- WARNECKE, A.: *Linustatin spaltende Diglucosidasen in Maniok (Manihot esculenta Crantz)* Diplomarbeit an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der TU Braunschweig (1995)
- WESTERMEIER, R.: *Elektrophorese-Praktikum*. VCH (1990), 167-172
- WÖHLER, F.; LIEBIG, J.: Über die Bildung des Bittermandelöls. In: *Annalen der Pharmacie* 22 (1837), 1-24